

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
"КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО" МОН УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
"КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО" МОН УКРАЇНИ

*Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису*

**Наумчук Юлія Анатоліївна**

УДК 612.398:547.96

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ СИСТЕМИ**  
**ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ГЛІОПРОТЕКТОРІВ АСТРОЦИТІВ ЗОРОВОГО**  
**НЕРВУ**

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело:



Ю. А. Наумчук

**Науковий керівник:** Максименко Віталій Борисович, д.м.н., професор.

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

**Наумчук Ю. А. – Біотехнологічні основи лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, 2018.

У дисертації представлені результати розробки та оптимізації платформи скринінгу гліопротекторних засобів для лікування глаукоми.

Астроцити голівки зорового нерва (АГЗН) є основним типом гліальних клітин у немієлінованій голівці зорового нерва (ГЗН), де вони беруть участь у синтезі позаклітинного матриксу. Патологічні зміни при глаукомі включають реактивний астроцитоз, для якого характерні зміни у експресії генів і білків астроцитів, а також ремоделінг зовнішньоклітинного матриксу. Астроцити голівки зорового нерва є надзвичайно чутливими до механічного та оксидативного стресу, що призводить до ініціації ушкодження аксонів на ранніх стадіях патогенезу. Більше того, АГЗН є надзвичайно важливими для підтримки нормальної фізіології та функції гангліонарних клітин сітківки. Таким чином, гліопротекторні стратегії з метою збереження та (або) відновлення структуральної й функціональної життєздатності АГЗН для уповільнення глаукоми та пов'язаних захворювань має велике клінічне значення. Наявні методи оцінки терапевтичного впливу гліопротекторів на АГЗН мають високу вартість і трудомісткість. Проблема недосконалості цих методів є перешкодою на шляху розробки нових гліопротекторів, її вирішення потребує нових біотехнологічних рішень. Саме тому метою цієї роботи є наукове обґрунтування та розробка біотехнологічного методу ефективно оцінки гліопротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій на основі

системи тестів оксидативного стресу в клітинній культурі АГЗН при глаукомі. Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі завдання: 1) отримання та оптимізація умов культивування первинної культури АГЗН щурів; 2) розробка та валідація тесту вивільнення лактатдегідрогенази (ЛДГ) для культури АГЗН; 3) верифікація дії *трет*-бутилгідропероксид (tBHP) як індуктора оксидативного стресу для АГЗН; 4) оцінка ефектів оксидативного стресу та гіпербаричного тиску (ГБТ) на АГЗН; 5) порівняльна оцінка розроблених та наявних методик тестування фармакологічних субстанцій для захисту АГЗН з використанням прототипних антиоксидантів.

Для створення модельної системи тестування гліопротекції було розроблено протокол отримання і культивування первинних АГЗН. Було встановлено, що оптимальний ріст АГЗН відбувається за температури 37 °С, відносної вологості 95 % та концентрації CO<sub>2</sub> 5 % на живильному середовищі DMEM (модифікованому за способом Дульбеко середовищі Ігла) із вмістом 4500 мг/л глюкози, 20 % фетальної телячої сироватки без додавання пірувату. Експериментально підтверджено, що оптимальною поверхнею для росту культури АГЗН є полі-L-лізин (PLL), який забезпечував найкоротший термін подвоєння (22 год), і найменшу варіабельність параметрів росту.

Для отриманої культури АГЗН було проведено імуноцитохімічні дослідження щодо наявності специфічних маркерів астроцитів, включаючи глутамат-аспартатний транспортер, підтип 1 (EAAT1), гліальний фібрилярний білок (GFAP) та S100 гліальний кальційзв'язуючий білок β (S100β). У результаті було показано, що отримана культура АГЗН експресувала всі три астроцитарні маркери – EAAT1, GFAP, і S100β, – що підтвердило її приналежність до астроцитів.

У межах розробки біотехнології тестування гліопротекторів АГЗН було вдосконалено тест вивільнення ЛДГ для отриманої культури АГЗН. Для оптимізації тесту було визначено оптимальні періоди інкубації з

індуктором оксидативного стресу tBHP – 5 год, а також із тест-реагентом – 1 год. Під час порівняння розробленого ЛДГ-тесту з комерційним аналогом значних відмінностей у точності аналізу не спостерігалось. Тому виконана у цій частині роботи оптимізація методу дозволила отримати ЛДГ-тест, який не поступається комерційному аналогу за точністю, але при цьому має нижчу вартість (1,2 \$ за 96-лунковий планшет) і може бути оптимізований для конкретних завдань.

Ефективність tBHP як індуктора оксидативного стресу було підтверджено в тесті оцінки рівня реактивних форм кисню (РФК) – DCFDA (2',7'-дихлорофлуоресциндіацетат). Вимірювання флуоресценції DCFDA показало збільшення рівнів РФК зі збільшенням концентрації tBHP, зокрема у разі обробки максимальною концентрацією tBHP (500 мкМ) спостерігалось п'ятикратне збільшення флуоресценції 2',7'-дихлорофлуоресциндіацетату (DCF) порівняно з контролем. Це засвідчило здатність tBHP виступати індуктором оксидативного стресу в культурі АГЗН. Для визначення ефектів впливу оксидативного стресу на виживання АГЗН за допомогою альтернативних методик було проведено тест виживання клітин, оснований на поглинанні ацетоксиметил кальцеїнового ефіру (кальцеїну-АМ), що підтвердило здатність tBHP знижувати виживання клітин у культурі АГЗН. Таким чином, за допомогою додаткових аналізів рівнів РФК і виживання клітин було підтверджено валідність використання tBHP як індуктора оксидативного стресу в культурі АГЗН.

З метою визначення фактора патогенного впливу було вивчено ефекти реактивного астроцитозу на культуру АГЗН. Для індукції реактивного астроцитозу було використано ГБТ (25–35 мм рт. ст. протягом 16–20 год). Кількісне визначення рівнів вивільнення ЛДГ не показало відмінностей у виживанні контрольних клітин і клітин після впливу ГБТ. Разом з тим дослідження впливу хімічного індуктора оксидативного стресу tBHP на АГЗН при атмосферному тиску і ГБТ з використанням розробленого ЛДГ і комерційного МТТ (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолій

бромід) тестів показало, що інкубація АГЗН в умовах ГБТ підвищувала їх чутливість до дії tВНР, що знайшло відображення у зсуві значень  $EC_{50}/IC_{50}$  (напівмаксимальна ефективна концентрація / напівмаксимальна інгібуюча концентрація) в обох тестах. Для уточнення взаємозв'язку основних факторів патогенного впливу було визначено вплив ГБТ на рівні РФК в АГЗН. Візуалізація за допомогою індикатора CellROX показала значне підвищення рівнів РФК в АГЗН, інкубованих за підвищеного тиску. Таким чином, було охарактеризовано роль РФК як патофізіологічного фактора при глаукомі, що дозволило надалі використовувати хімічно індукований оксидативний стрес tВНР як єдиний фактор патогенного впливу, що спростило технологію використання розробленої ЛДГ-платформи.

Нарешті, було проведено порівняльне оцінювання розробленої ЛДГ-системи з комерційним тестом виживання клітин МТТ з використанням прототипного антиоксиданту Тролоксу та нутрицевтичного агента Ресвератролу. В обох тестах було підтверджено здатність Тролоксу та Ресвератролу протидіяти впливу оксидативного стресу індукованого tВНР. Крім того, не було виявлено достовірних відмінностей для значень  $EC_{50}$  (tВНР), отриманих у ЛДГ- і МТТ-тестах. Це підтверджує, що розроблена платформа ЛДГ-тестування не поступається за точністю та об'єктивністю отриманих результатів загальноприйнятим методикам і перевершує їх за простотою та економічністю.

Таким чином, оптимізована та валідована платформа тестування гліопротекторних засобів може бути рекомендована до практичного застосування при розробці терапевтичних стратегій для лікування глаукоми.

**Ключові слова:** глаукома, астроцити голівки зорового нерва, лактатдегідрогеназний тест, оксидативний стрес, гліопротекція.

## SUMMARY

**Naumchuk Y.A. – Biotechnological basis of a lactate dehydrogenase system for testing glioprotective compounds in optic nerve head astrocytes. – Manuscript.**

Thesis to obtain the scientific degree of Candidate of Biological Sciences (PhD) in specialty 03.00.20 – biotechnology. – National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", MES of Ukraine, Kyiv, 2018.

This thesis presents the results of the development and optimization of a standardized plate reader-based screening platform for glioprotective compounds in optic nerve head astrocytes.

Optic nerve head astrocytes (ONHAs) are the major glia cell type in the non-myelinated optic nerve head where they contribute to extracellular matrix synthesis. Pathological changes in glaucoma include reactive astrocytosis, a process characterized by altered astrocyte gene and protein expression and extracellular matrix remodeling. ONHAs are highly sensitive to mechanical and oxidative stress resulting in the initiation of axon damage early during pathogenesis. Furthermore, ONHAs are crucial for the maintenance of retinal ganglion cell physiology and function. Therefore, glioprotective strategies with the goal to preserve and/or restore the structural and functional viability of ONHAs to slow progression of glaucoma and related pathologies are of high clinical relevance. Available methods for the evaluation of drug candidates with glioprotective potential in ONHAs are poorly developed, laborious and costly, thus causing a challenge for the development of the novel glioprotective strategies. Biotechnological approaches are needed to develop a standardized platform for screening glioprotective compounds. Therefore, the objective of this work was to establish the scientific premise for glioprotection in primary ONHA culture and to develop a biotechnological method for the screening

of glioprotective compounds based on their efficacy in reducing or preventing the deleterious effects of oxidative stress in ONHAs.

We formulated the following five specific aims to reach our objective: 1) optimization of the isolation and culturing techniques for primary rat ONHAs; 2) development and validation of a lactate dehydrogenase (LDH) release assay for ONHAs; 3) optimization of chemically-induced oxidative stress to use as an insult in primary rat ONHAs; 4) evaluation of the effects of oxidative stress and hyperbaric pressure on ONHAs; 5) validation of the glioprotective screening platform using antioxidants in primary rat ONHA culture.

We devised a novel protocol for the primary culture of ONHAs derived from adult rats. The optimal media composition for both isolation and culture of primary adult rat ONHAs was determined as Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), containing 4,5 g/l glucose and supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum, without the addition of sodium pyruvate. Furthermore, our data suggest that proliferation and survival of ONHAs are maximal when using tissue culture coated plastics or poly-L-lysine coated glass.

In order to validate the astrocytic identity of the obtained primary cultures, cells were immunostained for the specific astrocytic markers: excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1), glial fibrillary acidic protein (GFAP), and the glial calcium binding protein S100 $\beta$ . Primary ONHA cultures that were isolated using the described method showed strong expression of all three specific astrocyte markers and minimal to no contamination by other cell types.

To develop a biotechnological platform for the screening of glioprotective compounds, we developed a protocol for a custom LDH assay using chemically-induced oxidative stress, tert-butylhydroperoxide (tBHP), as an inducer of reactive oxygen species (ROS). Our comparison of the newly developed LDH release assay with a commercially available test kit revealed no statistically significant differences in sensitivity while being far less expensive when compared to the commercial assay. Another important advantage of our custom



protocol is the ability to refine the protocol for specific compounds given the known formulation of all reagents.

Next, we optimized the conditions for the use of tBHP as an inducer of oxidative stress in primary rat ONHA culture. The generation of ROS was confirmed using the fluorescent ROS sensor, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). Quantification of dicarboxyfluorescein fluorescence showed an approximately 5-fold increase in ROS levels upon treatment with increasing concentrations of tBHP. tBHP-induced oxidative stress resulted in a dose-dependent loss of cell viability that was assessed using three different assays that each quantify a different physiological mechanism that can serve as correlate of cell viability. The calcein-AM uptake test utilizes the activity of endogenous cytosolic esterases, while the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) assay relies on the activity of mitochondrial reductases. Data from these assays were compared to the results of the newly developed LDH assay. All three assays yielded similar  $EC_{50}/IC_{50}$  values for tBHP. Therefore, screening of glioprotective compounds using the developed LDH assay is predicted to provide an accurate reflection of the effects of glioprotective compounds on the physiological function and survival of ONHAs.

To identify a disease relevant insult, we studied the cellular effects of reactive astrocytosis on primary adult rat ONHA culture. Reactive astrocytosis was induced by exposure to hyperbaric pressure (25-35 mm Hg above ambient pressure for 16-20 hr). Quantification of LDH release levels revealed no statistically significant effects on cell viability, however, exposure to hyperbaric pressure resulted in a significant sensitization to oxidative stress, as revealed by a shift in the  $EC_{50}/IC_{50}$  values for tBHP in both MTT and LDH assays. Quantification of ROS levels following exposure to hyperbaric pressure showed a statistically significant increase in cellular oxidative stress. Specifically, we identified an increase in CellROX fluorescence using fluorescence microscopy and a statistically significant increase in dicarboxyfluorescein fluorescence using a fluorescence microplate reader (DCFDA test). These data identify increased



cellular levels of ROS in ONHAs as a pathophysiological component of glaucoma and provide the scientific premise of using chemically-induced oxidative stress as insult for the screening of glioprotective compounds using our standardized LDH assay platform.

Lastly, we validated our biotechnological platform that relies on a newly developed LDH release assay for the screening of glioprotective compounds. The prototypic antioxidant Trolox and the nutraceutical Resveratrol were tested for their glioprotective properties in our LDH assay platform and results were compared with a commercially available MTT cell viability assay kit. Both compounds exerted potent glioprotective effects. Notably, we did not identify a statistically significant difference between  $EC_{50}/IC_{50}$  values for tBHP obtained from LDH and MTT assays.

In conclusion, we developed and validated a standardized biotechnological screening platform for the quantitative assessment of glioprotective properties of chemical compounds in primary adult rat ONHA culture. We recommend the use of our standardized screening platform for advancing the development of novel glioprotective therapeutic strategies for the management of glaucoma.

**Keywords:** glaucoma, optic nerve head astrocytes, lactate dehydrogenase assay, oxidative stress, glioprotection.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

**Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:**

1. **Наумчук Ю. А.** Оптимізація тестів життєздатності клітин для скринінгу гліопротекторних сполук у культурі первинних астроцитів головки зорового нерву щура / **Ю. А. Наумчук**, В. Б. Максименко, С. Кая // Наук. вісті НТУУ «КПІ». – 2017. – № 6. – С. 20–26.

2. Kaja S. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, P. Koulen. Current Protocols in Toxicology. – 2017. – Vol. 72, Issue 1. – P. 2.26.1–2.26.10.

3. Kaja S. Plate reader-based cell viability assays for glioprotection using primary rat optic nerve head astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. Levy, D. H. Zaidi, A. M. Altman, S. Nawazish, J. K. Ghuman, B. C. Gerdes, M. A. Moore, P. Koulen // Experimental Eye Research. – 2015. – Vol. 138. – P. 159–166.

4. Kaja S. Differential subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, K. R. Patel, **Y. Naumchuk**, P. Koulen // Exp Neurol. – 2015. – Vol. 265. – P. 59–68.

5. Payne A. J. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina / A. J. Payne, S. Kaja, **Y. Naumchuk**, N. Kunjukunju, P. Koulen // Int J Mol Sci. – 2014. – Vol. 15. – P. 1865–1886.

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

6. Ghosh A. K. Aberrant calcium channel expression is associated with reactive astrogliosis in optic nerve head astrocytes [Electron. resource] / A. K. Ghosh, V. R. Rao, **Y. Naumchuk**, E. B. Stubbs Jr, S. Kaja // Society for Neuroscience Annual Meeting. – San Diego, CA, 2018. – Access link: <https://abstractsonline.com/pp8/#!/4649/presentation/29540>

7. Kaja S. Intracellular signaling in astrocytes in response to elevated hydrostatic pressure [Electron. resource] / S. Kaja, V. R. Rao, **Y. Naumchuk**, A. J. Payne // Society for Neuroscience Annual Meeting. – Washington, D.C., 2017. – Access link: <http://www.abstractsonline.com/pp8/index.html#!/4376/presentation/19251>

8. **Naumchuk Y.** Characterization of calcium channel expression in primary optic nerve head astrocytes / **Y. Naumchuk**, V. R. Rao, J. C. Floss, A. Rockwell, V. Husak, S. Kaja // Hines VA Research Day, May 2017.

9. **Naumchuk Y.** Characterization of calcium channel expression in primary optic nerve head astrocytes / **Y. Naumchuk**, V. R. Rao, A. D. Hegel, A. Rockwell, V. Husak, S. Kaja // 13th Scientific Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 2017. – Florence, Italy.

10. Kaja S. Glioprotection of adult optic nerve head astrocytes [Electron. resource] / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, E. G. Sieck, D. H. Voelker, D. H. Zaidi, P. Koulen // Society for Neuroscience Annual Meeting 2015, Program #384.02; Oct. 19, 2015. – Chicago, IL. – Access link: <http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=01c144f6-b2fa-4606-971f-a4445c8804ff&cKey=1ffb9aec-094c-4b96-b0be-2a124cec42b3&mKey=d0ff4555-8574-4fbb-b9d4-04eec8ba0c84>

11. Kaja S. Novel plate reader-based assay measuring glioprotection in primary adult optic nerve head astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. H. Zaidi, S. Nawazish, D. Levy, B. C. Gerdes, P. Koulen // ARVO Meeting 2015; May 2–7, 2015. – Denver CO. – Vol. 56, No. 7. – P. 420.

12. **Naumchuk Y.** Differential control of intracellular calcium signaling in primary adult rat optic nerve head astrocytes / **Y. Naumchuk**, A. J. Payne, K. R. Patel, S. Kaja, P. Koulen // Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015; Charleston, SC, Feb 26–29. – 2015. – P. 135.

13. Kaja S. Novel plate reader-based assay measuring glioprotection in primary optic nerve head astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. H. Zaidi, S. Nawazish, D. Levy, J. K. Ghuman, B. C. Gerdes, P. Koulen // Association for

Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015; Charleston, SC, Feb 26–29. – 2015. – P. 109.

14. Kaja S. Primary rat optic nerve head astrocyte culture for glioprotection studies in glaucoma / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. L. Levy, A. M. Altman, B. C. Gerdes, P. Koulen // 7<sup>th</sup> Ocular Diseases Drug Discovery Conference; Mar 19–20. – San Diego CA.

15. Koulen P. IP<sub>3</sub> and ryanodine receptors control intracellular calcium signaling in adult rat optic nerve head astrocytes / P. Koulen, A. J. Payne, K. R. Patel, **Y. Naumchuk**, S. Kaja // ARVO Meeting 2014; Program #2274, Orlando FL, May 3–8, 2014. – Vol. 55, No. 13. – P. 2274.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ .....	16
ВСТУП .....	18
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	23
1.1 Загальна характеристика та епідеміологія глаукоми .....	23
1.2 Роль оксидативного стресу при глаукомі .....	23
1.3 Сучасні стратегії лікування глаукоми: необхідність розробки нових біотехнологічних підходів .....	28
1.4 Нейропротекторні підходи до лікування глаукоми .....	29
1.5 Гліопротекція в лікуванні глаукоми .....	33
1.6 Застосування первинної культури АГЗН для скринінгу фармацевтичних субстанцій із гліопротекторною дією .....	34
1.7 Оцінка життєздатності клітин як інструмент скринінгу фармацевтичних субстанцій із гліопротекторною дією .....	35
1.7.1 Метод поглинання кальцеїну-АМ .....	35
1.7.2 МТТ-тест .....	37
1.7.3 Кількісне визначення лактатдегідрогенази .....	42
1.8 Оцінка рівня оксидативного стресу як інструмент скринінгу гліопротекторних сполук .....	44
Висновки до розділу 1 .....	46
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ .....	47
2.1 Матеріали .....	47
2.2 Методи .....	48
2.2.1 Первинна культура астроцитів голівки зорового нерва щурів .....	48
2.2.2 Імуноцитохімія та отримання зображень .....	49
2.2.3 Модель індукції оксидативного стресу .....	51
2.2.4 Кількісний метод оцінки РФК у клітинах із застосуванням FDA ....	52
2.2.5 Оцінка життєздатності клітин методом поглинання кальцеїну-АМ .....	52

2.2.6 МТТ-тест .....	53
2.2.7 Кількісна оцінка загибелі клітин .....	54
РОЗДІЛ 3 ВИДІЛЕННЯ АСТРОЦИТІВ ГОЛІВКИ ЗОРОВОГО НЕРВА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ .....	55
3.1 Виділення астроцитів голівки зорового нерва та отримання первинної культури .....	55
3.2 Оптимізація складу середовища для культивування первинної культури АГЗН.....	58
3.3 Валідація первинної культури АГЗН за астроцитарними маркерами. ....	78
Висновки до розділу 3 .....	82
РОЗДІЛ 4 РОЗРОБКА ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ МЕТОДИКИ ТЕСТУВАННЯ ГЛІОПРОТЕКТОРІВ АСТРОЦИТІВ ГОЛІВКИ ЗОРОВОГО НЕРВА .....	84
4.1 Розробка платформи для скринінгу гліопротекторів на основі аналізу вивільнення ЛДГ .....	84
4.2 Продукція РФК у первинній культурі АГЗН протягом оксидативного стресу, індукованого tВНР.....	93
4.3 Стандартизація комерційних тестів для визначення життєздатності клітин для первинної культури АГЗН .....	94
4.4 Валідація розробленої нами скринінгової платформи на основі визначення ЛДГ за допомогою прототипного антиоксиданта Тролоксу.....	98
Висновки до розділу 4 .....	101
РОЗДІЛ 5 ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СТАНДАРТИЗОВАНОЇ ТА ВАЛІДОВАНОЇ ПЛАТФОРМИ ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ГЛІОПРОТЕКТОРНИХ СПОЛУК .....	103
5.1 Експозиція в умовах підвищеного тиску сенсibiliзує клітини первинної культури АГЗН до подальшої дії оксидативних чинників.....	103

5.2 Ресвератрол захищає клітини первинної культури АГЗН від дії оксидативних чинників .....	110	
Висновки до розділу 5 .....	112	
РОЗДІЛ 6 ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНА СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АНТИОКСИДАНТНИХ РЕЧОВИН (ЗАГАЛЬНЕ ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ) .....		113
ВИСНОВКИ.....	119	
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	121	
ДОДАТОК А. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ ТА АПРОБАЦІЇ .....	133	



## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ

АМ – ацетоксиметильна група

АГЗН – астроцити голівки зорового нерва

ВОТ – внутрішньоочний тиск

ГБТ – гіпербаричний тиск

ГЗН – голівка зорового нерва

ГКС – гангліонарні клітини сітківки

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЗКМ – зовнішньоклітинний матрикс

ЗН – зоровий нерв

Кальцеїн-АМ – ацетоксиметил-кальцеїновий ефір

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

РФК – реактивні форми кисню

Тролокс – 6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхром-2-карбонова кислота

ТС – трабекулярна сітка

BSA – бичачий сироватковий альбумін

B7T – *bis*-(7)-такрин

CS – сироватка телят

DAPI – 4',6-діамідино-2-феніліндол, дихлоргідрат

DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеїн

DCFDA – 2',7'-дихлорофлуоресциндіацетат

DMEM – модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла

DIV – дні *in vitro*

EC<sub>50</sub> – напівмаксимальна ефективна концентрація

ELAM-1 – молекули міжклітинної адгезії ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule 1, E-селектин)

EAAT1 – глутамат-аспарататний транспортер, підтип 1

FBS – ембріональна теляча сироватка  
 GFP – зелений флуоресцентний білок  
 GFAP – гліальний фібрилярний білок  
 GSTM1 – ізофермент глутатіон-S-трансфери GSTM1  
 GSTT1 – ізофермент глутатіон-S-трансфери GSTT1  
 Ham's F12 – живильне середовище Ham's F12  
 H2DCF – 2',7'-дихлорофлуоресцин  
 H2DCFDA – 2',7'-дихлорофлуоресциндіацет  
 H2DCFDA-AM – H2DCFDA ацетометилловий ефір  
 HBSS – збалансований сольовий розчин Хенкса  
 HEPES – 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазин-етансульфокислота  
 IC<sub>50</sub> – напівмаксимальна інгібуюча концентрація  
 INT – йодонітротетразолій хлорид  
 MPMS – 1-метокси-феназин метосульфат  
 MTT – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолій бромід  
 PBS – фосфатно-сольовий буфер  
 PDL – полі-D-лізин  
 PDLL – полі-D-лізин / ламінін  
 PLL – полі-L-лізин  
 RPMI 1640 – живильне середовище RPMI 1640 ( media developed by  
 Moore et al. at Roswell Park Memorial Institute)  
 S100β – гліальний кальційзв'язуючий білок S100β  
 SDS – натрію додецилсульфат  
 SOD – супероксиддисмутаза  
 tBHP – *tert*-бутилгідропероксид  
 8-OH-dG – 8-оксо-2'-дезоксигуанозин

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Глаукома є провідною причиною незворотної сліпоти, пов'язаної з пошкодженням сітківки та зорового нерва (ЗН) [1]. Приблизна кількість осіб, які страждають на глаукому, у 2013 р. становила 64,3 мільйони у світі та постійно зростає [2, 3]. Разом з тим точні патофізіологічні механізми, які лежать в основі виникнення глаукоми, є досі невстановленими [4, 5], що ускладнює розробку ефективних методів лікування. У наш час більшість терапевтичних підходів спрямовано на зниження внутрішньоочного тиску (ВОТ), що може лише уповільнити прояв симптомів захворювання, але в кінцевому підсумку не запобігає розвитку сліпоти.

Поряд з відомим набором антигіпертензивних офтальмологічних засобів з'явилися докази високої ефективності нейропротекції [5, 6] та гліопротекції [7, 8], які здатні забезпечити збереження зорової функції в умовах постійного підвищеного ВОТ [9, 10], а також при нормотензивній глаукомі [11, 12].

Астроцити голівки зорового нерва (АГЗН), які є основним типом гліальних клітин у голівці зорового нерва (ГЗН), критично важливі для синтезу зовнішньоклітинного матриксу (ЗКМ) [13]. За глаукоматозної ретинопатії в АГЗН ініціюються процеси реактивного астроцитозу, для яких характерні клітинна активація і міграція, ремоделінг ЗКМ та зміни в експресії генів і білків астроцитів [14]. Методи гліопротекції спрямовані на захист АГЗН та на запобігання розвитку реактивного астроцитозу. Наявні методи оцінки терапевтичного впливу гліопротекторів на ГЗН мають високу вартість та трудомісткість. Проблема недосконалості цих методів є перепорою на шляху розробки нових гліопротекторів, її вирішення потребує нових біотехнологічних рішень.

Наша робота спрямована на створення доступної, інформативної та простої системи скринінгу ефективності гліопротекторних фармакологічних

субстанцій на основі вивчення фізико-хімічних і біохімічних основ життєдіяльності, закономірностей росту і розвитку клітинних культур АГЗН при глаукомі та під впливом гліопротекторних лікарських субстанцій.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана в межах НДР факультету біомедичної інженерії Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» д/р № 0113U002334 код КВНТД: 1.212.11.17 (№ 2613-ф) «Діагностика станів серцево-судинної системи людини на основі гемодинамічних та метаболічних характеристик» (2014–2016 рр.), а також «Method development for drug screening in glaucoma» (2015–2018 рр.) Department of Molecular Pharmacology, Loyola University Chicago.

**Мета дослідження:** наукове обґрунтування та розробка біотехнологічного методу ефективної оцінки гліопротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій на основі системи тестів оксидативного стресу в клітинній культурі астроцитів голівки зорового нерва при глаукомі.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі **завдання:**

1. Отримання та оптимізація умов культивування первинної культури АГЗН щурів.
2. Розробка та валідація тесту вивільнення ЛДГ для культури АГЗН.
3. Верифікація дії tВНР як індуктора оксидативного стресу для АГЗН.
4. Оцінка ефектів оксидативного стресу ГБТ на АГЗН.
5. Порівняльна оцінка розроблених та наявних методик тестування фармакологічних субстанцій для захисту АГЗН з використанням прототипних антиоксидантів.

*Об'єкт дослідження* – біотехнологія системи скринінгу засобів захисту АГЗН.

*Предмет дослідження* – властивості АГЗН в умовах оксидативного стресу та ГБТ.

**Методи дослідження.** Біотехнологічні методи – культивування первинних тваринних клітин; імуноцитохімічні методи – імуноцитохімічне

фарбування клітинних маркерів; біофізичні методи – тести виживання клітин МТТ 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразолій бромід), вивільнення ЛДГ, поглинання кальцеїну-АМ (ацетоксиметил-кальцеїновий ефір) та тести вимірювання реактивних форм кисню в культурі клітин: CellROX® та DCFDA (2',7'-дихлорофлуоресциндіацетат); методи статистичної обробки даних з використанням MS Excel, Graph Pad Prism.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше розроблено оригінальну біотехнологію отримання культури первинних АГЗН дорослих щурів, які на відміну від клітин, виділених з молдих тварин та людських донорів за загальновідомими протоколами, мають єдину морфологію, а також є більш доречними у дослідженні такого вікового захворювання як глаукома. На основі отриманої культури вперше було розроблено лактатдегідрогеназний тест, адаптований саме під цю культуру клітин. Наявні методи оцінки оксидативного стресу і рівнів реактивних форм кисню (РФК) також були адаптовані до АГЗН. За допомогою зазначених методик вперше було показано роль гіпербаричного тиску на АГЗН. Було показано, що гіпербаричний тиск не знижує виживаності АГЗН, але підвищує чутливість АГЗН до оксидативного стресу шляхом збільшення рівня РФК, які генеруються клітинами. Таким чином, в результаті виконаних досліджень була розроблена і науково обґрунтована лактатдегідрогеназна система для тестування гліопротекторів АГЗН.

**Практична значимість отриманих результатів.** Результати роботи дозволили створити універсальну і високопродуктивну систему тестування фармакологічних субстанцій, спрямованих на гліопротекцію АГЗН. Отримана культура первинних АГЗН та адаптований до неї ЛДГ-тест надалі може бути використано для проведення біохімічних і функціональних досліджень патогенезу глаукоми. Розроблена система тестування гліопротекторів прискорить і спростить вибір нових, більш ефективних лікарських засобів.

**Впровадження.** Науково-методичні основи розробки ЛДГ-системи для тестування АГЗН впроваджено у навчальний процес з біомедичного напрямку аспірантів кафедри біології Інституту молекулярної біології і генетики (ІМБГ) НАН України та студентів кафедри молекулярної біології КНУ імені Тараса Шевченка, навчання яких проводиться за участі науковців ІМБГ НАН України в рамках лекційних занять з курсів «Основи новітньої молекулярної біології і генетики» та «Біотехнології з використанням стовбурових клітин». Акт впровадження № 5, від 7 червня 2018 року, код 05417101.

**Особистий внесок здобувача.** Результати досліджень, представлені в дисертаційній роботі, одержано особисто автором у відділі молекулярної фармакології Чиказького Університету Лойола (Department of Molecular Pharmacology, Loyola University Chicago) та на кафедрі біомедичної інженерії КПІ ім. Ігоря Сікорського. Автором особисто здійснено виділення культури первинних АГЗН та удосконалено умови їх культивування; підібрано біотехнологічні підходи для розробки ЛДГ-тесту, оптимізованого для АГЗН; за допомогою розробленого ЛДГ-тесту та комерційних тестів визначено ефекти оксидативного стресу та підвищеного тиску на життєздатність АГЗН та внутрішньоклітинні рівні РФК. Спільно зі співавторами публікацій проведено валідацію розроблених протоколів за допомогою загальновідомих антиоксидантів. Робота є результатом самостійних досліджень Наумчук Ю. А.

**Апробація результатів.** Основні положення дисертаційної роботи доповідалися на міжнародних науково-практичних конференціях: Society for Neuroscience Annual Meeting 2018, San Diego, CA, U.S.A.; Society for Neuroscience Annual Meeting 2017, Washington D.C, U.S.A.; Hines VA Research Day, May 2017, U.S.A.; 13th Scientific Meeting of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics 2017, Florence, Italy; Society for Neuroscience Annual Meeting 2015, Program #384.02, Oct 19, 2015, Chicago, IL, U.S.A.; ARVO Meeting 2015, Denver CO, May 2–7, 2015, U.S.A;

Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015, Charleston, SC, Feb 26–29, 2015, U.S.A.; Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics Annual Meeting 2015, Charleston, SC, Feb 26–29, 2015, U.S.A.; 7th Ocular Diseases Drug Discovery Conference, Mar 19–20, San Diego CA, U.S.A.; ARVO Meeting 2014 Program #2274, Orlando FL, May 3–8, 2014, U.S.A.

**Публікації.** За результатами досліджень опубліковано 15 наукових праць, у тому числі 4 статті в іноземних наукових фахових виданнях, 1 статтю у науковому фаховому виданні України, що входить до міжнародних наукометричних баз даних, 10 тез доповідей наукових конференцій.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, шістьох розділів, висновків, додатку та списку використаних джерел із 103 найменувань. Матеріали дисертації викладено на 136 сторінках, містять 30 рисунків, 10 таблиць.



## **РОЗДІЛ 1**

### **ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ**

#### **1.1 Загальна характеристика та епідеміологія глаукоми**

Глаукомна оптична нейропатія, також відома як глаукома, являє собою неоднорідну групу мультифакторних зорових розладів, характерною рисою яких є прогресуюча дегенерація гангліонарних клітин сітківки (ГКС), яка в подальшому призводить до глаукоматозної екскавації диска ЗН та прогресуючого звуження поля зору [1, 15, 16]. Згідно зі статистикою на глаукому страждають понад 70 мільйонів людей у світі, серед яких близько 10 % мають двосторонню сліпоту [15, 17], що дозволяє назвати глаукому провідною причиною незворотної сліпоти. За даними 2010 р. серед 32,4 мільйонів сліпих 2,1 мільйони втратили зір через глаукому. У 2013 р. кількість осіб віком від 40 до 80 років, що страждають на глаукому, становило 64,3 мільйони у світі. Прогнозується зростання цієї кількості до 76 мільйонів у 2020 р. та до 112 мільйонів у 2040 р. [18]. Глаукома може перетікати безсимптомно аж до настання критичних уражень, тому існує висока ймовірність того, що кількість хворих на глаукому насправді набагато більша за встановлену.

#### **1.2 Роль оксидативного стресу при глаукомі**

Патофізіологія глаукоми (рис. 1.1) характеризується патологічною тріадою – перебудовою ГЗН, атрофією ЗН та дегенерацією гангліонарних клітин сітківки (ГКС) [19, 20].

У патогенезі глаукоми задіяно численні механізми, які в результаті призводять до загибелі ГКС та втрати зору. Гіпотеза, згідно з якою визначальним фактором розвитку глаукоми є підвищений ВОТ, була майже повсюдно відхилена, оскільки значна кількість хворих на глаукому мають



На сьогодні загальноновизнаним є твердження, що глаукома – мультифакторне захворювання, і загибель ГКС при глаукомі є результатом дії низки механізмів. Ці механізми включають хронічну або транзиторну ішемію, ексайтотоксичність, оксидативний стрес, втрату трофічних факторів та синаптичну дисфункцію [22–24]. Цікаво відзначити, що багато з вищезазначених процесів розвивається в глаукоматозних тканинах внаслідок оксидативного стресу, або ж, навпаки, спричиняють підвищення рівня оксидативного стресу на ранніх стадіях глаукоми. Наприклад, ішемія призводить до незбалансованого метаболічного попиту клітин, що спричиняє утворення вільних радикалів та РФК [25]. Ексайтотоксичність може знизити активність переносника, який забезпечує антипорт цистин / глутамат, що призведе до виснаження внутрішньоклітинного глутатіону та подальшої загибелі клітин через окситоз – програмований шлях загибелі клітин, індукований оксидативним стресом [26, 27]. Аналогічним чином, дисфункція мітохондрій внаслідок синаптичного старіння та наступна втрата трофічного забезпечення через зменшення аксонального транспорту спричиняє підвищення рівня оксидативного стресу, зниження рівня антиоксидантних ферментів та окисне пошкодження мітохондріальної ДНК. Клінічні докази оксидативного стресу в глаукоматозних тканинах є підґрунтям для розвитку нейропротекторних стратегій лікування глаукоми.

На сьогодні накопичено чимало фактів, які доводять ключову роль підвищення рівня оксидативного стресу в патогенезі глаукомної нейропатії. У багатьох клінічних дослідженнях при глаукомних нейропатіях встановлено підвищення рівня оксидативного стресу, окисне пошкодження ДНК та порушення функції мітохондрій в уражених тканинах. Один із найбільш ранніх доказів оксидативного стресу був отриманий Wang et al. [28], які виявили в клітинах трабекулярної сітки (ТС) ока людини при глаукомі молекули міжклітинної адгезії ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule 1) [28], оскільки ELAM-1, відомий як діагностичний

маркер атеросклеротичних бляшок у судинній системі, відіграє важливу роль у захисній клітинній відповіді проти оксидативного стресу.

Ці результати дали поштовх дослідженням оксидативного пошкодження ДНК в ТС людини. Розробка біохімічного методу для аналізу 8-ОН-dG (8-оксо-2'-дезоксигуанозину) як корелята пошкодження мітохондріальної ДНК в біоптатах ТС людини уможливила визначення активності ізоферментів глутатіон-S-трансферази (GSTM1 та GSTT1) в ТС людини. Встановлено, що рівень 8-ОН-dG суттєво підвищувався у хворих на глаукому, причому окисне пошкодження ДНК мало сильну кореляцію з BOT та дефектами поля зору [29]. Крім того, GSTM1-нуль генотип корелював з вищим рівнем 8-ОН-dG та траплявся статистично частіше у пацієнтів з первинною відкритокутовою глаукомою порівняно з контрольними особами [29]. В окремому дослідженні встановлено статистично значущі кореляції між окисним пошкодженням у ТС людини та ураженням поля зору і BOT [17]. Іншою дослідницькою групою було підтверджено збільшення частоти алеля GSTM1-нуль серед хворих на відкритокутову глаукому, проте результати не є статистично значущими, ймовірно, через невеликий розмір вибірки [30].

Суттєве зниження загального антиоксидантного потенціалу у водянистій волозі пацієнтів з первинною відкритокутовою глаукомою при одночасному збільшенні втричі продукції глутатіону дозволяє припустити, що оксидативний стрес унаслідок порушення функції мітохондрій призводить до збільшення рівня ферментів антиоксидантного захисту, але спричиняє зниження загального антиоксидантного потенціалу [31]. Імуногістохімічне виявлення нітротирозину у препаратах посмертної біопсії передламінарного відділу ГЗН показало пероксинітрит-опосередковане пошкодження ендотеліальних клітин та гладких м'язів, а також астроцитів [32]. Імунореактивність до нітротирозину позитивно корелювала з прогресуванням захворювання і була, порівняно із тканиною з нормальних контрольних очей, значно вищою у глаукоматозних тканинах [32].

Аналогічні результати, які доводять підвищення рівня оксидативного стресу у глаукоматозних тканинах, були отримані при дослідженні клітин решітчастої пластинки (*lamina cribrosa*) людини на основі кількісної оцінки продукції РФК у тесті визначення продуктів реакції з тіобарбітуровою кислотою [33]. У клітинах решітчастої пластинки з глаукоматозних очей порівняно з клітинами решітчастої пластинки здорових донорів виявлено порушення функції мітохондрій та екструзії кальцію [33].

Метою кількох досліджень, проведених у 2010 р., було встановлення біомаркерів при глаукомі. У багатоцентрових дослідженнях за схемою «пацієнт – контроль» у сироватці крові пацієнтів із глаукомою та здорових осіб (контроль) визначали ряд продуктів окиснювальної деградації, антиоксидантів, у тому числі вітаміну Е, та ферментів антиоксидантного захисту [34]. Хоча відмінності між пацієнтами з глаукомою та здоровими людьми були статистично значущими для всіх потенційних біомаркерів, автори відзначили велику варіабельність усіх параметрів. Однак, на думку авторів, найбільш послідовним та переконливим біомаркером слід вважати вітамін Е, який був підвищений у групі пацієнтів з глаукомою та для якого показано статистично значущу кореляцію з клінічними критеріями прогресування захворювання, включаючи ВОТ і гостроту зору [34]. Ця робота висвітлила, наскільки складно встановити справді специфічні для глаукоми біомаркери у крові та актуальність створення нових панелей біомаркерів, специфічних для цієї хвороби. Проте дослідження крові надають додаткові факти, які доповнюють значну кількість даних, що свідчать про оксидативний стрес при глаукомі. У виконаному у 2011 р. дослідженні у сироватці хворих на глаукому визначали загальний антиоксидантний потенціал та супероксиддисмутазу як показники стану антиоксидантної системи, а також загальний оксидантний статус та декілька показників оксидативного стресу (NO, карбонільні похідні білка та малоновий діальдегід) [35]. Отримані дані переконливо демонструють пригнічення антиоксидантного захисту та підвищення рівня оксидативного

стресу як при первинній відкритокутовій глаукомі, так і при псевдоексфоліативній глаукомі [35], що може вказувати на однакову роль оксидативного стресу при різних етіологіях захворювання та викликає особливий інтерес. Результати дослідження сироватки крові пацієнтів з первинною закритокутовою глаукомою також вказують на наявність оксидативного стресу [36]. Таким чином, велика кількість клінічних даних підтверджує роль оксидативного стресу та порушення функції мітохондрій в патогенезі глаукоми.

### **1.3 Сучасні стратегії лікування глаукоми: необхідність розробки нових біотехнологічних підходів**

Із патофізіологічної та терапевтичної точки зору при глаукомі головним фактором ризику, який піддається впливу, є збільшення ВОТ, спричинене зменшенням відтоку водянистої вологи через трабекулярну сітку або через увеосклеральний шлях, оскільки розвиток глаукоми зазвичай уповільнюється, якщо знизити цей тиск на 30–50 % від вихідного рівня. Таке асоціативне поєднання свідчить про те, що ВОТ при глаукомі перевищує поріг сприйнятливості ГЗН до тиску, при якому виникає глаукоматозне пошкодження нерва. На сьогоднішній день контроль ВОТ є єдиною доведеною та загальноприйнятою стратегією терапії глаукоми. Зниження ВОТ досягається за допомогою фармацевтичних засобів, лазеротерапії або хірургічного втручання [18].

Незважаючи на те, що методи, спрямовані на зниження ВОТ, здатні уповільнити пошкодження ЗН, загибель ГКС та АГЗН продовжується, що призводить до прогресуючої втрати зору [19, 37]. Терапія, спрямована на зниження ВОТ, часто втрачає ефективність з часом, потребує педантичного дотримання пацієнтами, що становить певну проблему або має суттєві побічні ефекти. Все це робить її застосування проблематичним при хронічному захворюванні, яке потребує тривалого лікування. Клінічний



менеджмент ускладняється тим, що терапія, спрямована на зниження ВОТ, є практично неефективною при деяких формах глаукоми [24]. Таким чином, розробка нових підходів до лікування глаукоми є актуальним завданням.

#### **1.4 Нейропротекторні підходи до лікування глаукоми**

На сьогодні встановлено безліч фактів, які переконливо свідчать про наявність незалежного від ВОТ механізму втрати зору. Відомо чимало клінічних даних щодо нормотензивної глаукоми [11]. Розроблено експериментальні моделі глаукоми, в яких розвиток глаукоми відбувається без підвищення ВОТ [12]. Це висвітлює необхідність альтернативних підходів до лікування, у тому числі на основі методів, спрямованих на нейропротекцію [6, 38] та гліопротекцію [7, 8]. Справді, було показано, що нейропротекція може забезпечити збереження зорової функції навіть за наявності постійно підвищеного ВОТ як механізму, що спричиняє хворобу [10, 39].

Розроблювані нейропротективні стратегії при глаукомі мають на меті запобігти втраті ГКС або призупинити цю втрату і таким чином уповільнити розвиток глаукомної нейропатії. Враховуючи роль оксидативного стресу в патофізіології глаукоми, кандидати у нейропротектори мають бути перевірені на їхню здатність підвищувати стійкість клітин до пошкоджувального впливу оксидативного стресу або наявність власної антиоксидантної дії.

Захисну дію антиоксидантів при глаукомі вивчали лише в кількох доклінічних дослідженнях. Ймовірною причиною цього слід вважати відсутність релевантних моделей глаукоми на тваринах, які б точно відтворювали етіологію розвитку хвороби людини, а також значні труднощі, пов'язані з проведенням довгострокових лонгітюдних досліджень. Крім того, основною проблемою розробки терапевтичних методів лікування глаукоми залишається питання доставки ліків до нейронів сітківки для



зменшення або попередження патологічних змін. Така проблема характерна для ЦНС загалом, де труднощі з доставкою ліків є серйозною перепорою розвитку ефективної нейропротективної терапії.

Нещодавно в експериментальній моделі глаукоми на мишах лінії DBA/2J було показано, що антиоксидант  $\alpha$ -ліпоева кислота захищає ГКС, покращує ретроградний аксонний транспорт у зоровому нерві та збільшує експресію генів і білків системи антиоксидантного захисту [40]. Однак, на жаль, не існує відповідних функціональних проб, які дозволили б коректно оцінити вплив на візуальні характеристики у мишей, і це, як показано раніше [9], є слабким місцем вищенаведеної експериментальної моделі. Проте нещодавно опубліковане дослідження з використанням моделі глаукоми на щурах показало, що очні краплі, які містять  $17\beta$ -естрадіол, забезпечують ефективну нейропротекцію та запобігають зниженню гостроти зору навіть у разі постійно підвищеного ВОТ [10]. У доклінічних моделях на тваринах показано, що естрогени ефективно захищають сітківку [41] та можуть діяти як прямі скавенджери вільних радикалів аналогічно фенольним антиоксидантам [42].

У 2012 р. завершено третю фазу клінічного дослідження («Вплив оральних універсальних антиоксидантів на розвиток глаукоми», NCT01544192), в якому проведено випробування трьох антиоксидантів ( $\alpha$ -токоферол, *Ginkgo biloba* та антиоксидантна формула).

Інший напрям розробки лікарських засобів – це препарати з нейропротекторною дією. Проте, незважаючи на успіх нейропротективних стратегій у доклінічних моделях, практично всі з більш ніж 100 клінічних досліджень з нейропротекції при глаукомі зазнали невдачі на другій або третій фазах клінічних випробувань через невиконання вимог стандартів ефективності або безпеки пацієнтів.

Не увінчалися успіхом і найбільші клінічні випробування з нейропротекції для лікування глаукоми, в яких досліджували ефективність мемантину – антагоніста NMDA-рецепторів. Про деталі цих випробувань,

які проводились Allergan Inc. (Ірвін, штат Каліфорнія, США, «Мемантин у хворих із хронічною глаукомою», [clinicaltrials.gov NCT00168350](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00168350)), не повідомлялось, але препарат не досяг первинної кінцевої точки клінічних випробувань, а в других випробуваннях 3-ї фази не вдалося повторити отримані у попередньому дослідженні статистично достовірні результати щодо ефективності препарату за функціональними критеріями, обраними для вторинної кінцевої точки.

З огляду на успіх мемантину як когнітивного підсилювача, що був затверджений FDA у 2003 р. для випадків середньої та важкої хвороби Альцгеймера [43], а також велику кількість доказів його ефективності як нейропротектора, які були отримані при доклінічних дослідженнях глаукоми [5, 44, 45], залишається незрозумілим, чому мемантин не пройшов клінічні випробування. Найбільшими проблемами, які виникли при організації клінічних випробувань мемантину з метою його застосування для нейропротекції, стало визначення параметрів кінцевої точки та вибір суб'єктів випробування. У той час, як успіх більшості доклінічних досліджень визначається молекулярними або клітинними критеріями, за якими оцінюють результат, кінцеві точки випробувань, які проводяться на людях, критично залежать від настання функціонального поліпшення або ослаблення швидкості погіршення візуальних характеристик. Досягнення будь-якого з цих результатів є довготривалим процесом.

Перспективним напрямом лікування нейродегенеративних захворювань може стати розробка комплексних засобів, які поцілили б одразу декілька патогенетичних механізмів розвитку захворювання, зокрема, оксидативний стрес та ексайтотоксичність. Так, застосування при хворобі Альцгеймера антагоніста NMDA-рецепторів мемантину може попередити некроз нейронів, викликаний ексайтотоксичністю, але не впливає на апоптоз, спричинений хронічно підвищеним рівнем оксидативного стресу [46]. Поєднання мемантину та вітаміну D, який проявляє нейропротекторні, антиоксидантні та протизапальні властивості,

в одному препараті може значно ефективніше запобігти втраті нейронів. Наразі триває набір пацієнтів в лікарні університету Angers (Франція) для клінічного випробування нового препарату, що містить мемантин та вітамін D (дослідження AD-IDEA, NCT01409694). Враховуючи патогенетичні аспекти розвитку глаукоми, поєднання антагоніста NMDA-рецепторів з вітаміном D може бути перспективною стратегією і для її лікування [46].

Нові хімічні сполуки, отримані шляхом кон'югації мемантину з антиоксидантами, також довели свою перспективність *in vitro*. Наприклад, встановлено здатність  $\alpha$ -ліпоевої кислоти, ковалентно зв'язаної з мемантином, проявляти антиоксидантну активність *in vitro*, проходити через гематоенцефалічний бар'єр та суттєво пригнічувати агрегацію  $\beta$ -амілоїду (фрагмент 1-42) [47]. Враховуючи позитивні ефекти  $\alpha$ -ліпоевої кислоти в експериментальній моделі глаукоми [40] та доклінічні та клінічні дані про безпечність мемантину, цю нову сполуку можна вважати перспективним кандидатом у препарати для лікування глаукоми.

Іншою новою хімічною сполукою, отриманою шляхом кон'югації, є *bis*-(7)-такрин (B7T), який складається з двох залишків такрину, з'єднаних алкільною групою із семи атомів карбону [48]. Такрин є інгібітором ацетилхолінестерази та призначається в деяких випадках хвороби Альцгеймера. Однак виявлено, що B7T проявляє нейропротекторні властивості, ймовірно, як антагоніст NMDA-рецепторів [49], блокуючи ексайтотоксичність та попереджуючи стрімкий розвиток оксидативного стресу внаслідок надходження позаклітинного кальцію [50]. Як у первинній культурі ГКС новонароджених щурів, так і в моделі *in vivo* показано зниження NMDA-індукованого апоптозу завдяки застосуванню B7T [51]. Причому, як встановлено в цих доклінічних дослідженнях, ефективність B7T перевищувала ефективність мемантину, а побічні ефекти були меншими, ніж у мономера такрину. Але ця сполука ще не дійшла до клінічних випробувань.

Таким чином, дані доклінічних досліджень не тільки підтверджують роль оксидативного стресу як важливого патогенетичного механізму розвитку глаукоми, але й висвітлюють нагальну потребу в клінічно релевантних експериментальних моделях глаукоми для перевірки впливу антиоксидантів на клінічно значимі показники. Не менш важливим є прискіпливий вибір критеріїв для зарахування та чітке визначення кінцевих точок нових клінічних випробувань, в яких перевірятимуть нові сполуки або терапевтичні препарати комбінованої дії на основі сумісного застосування нейропротекторів та антиоксидантів при глаукомі.

### **1.5 Гліопротекція в лікуванні глаукоми**

Незважаючи на те, що методи нейропротекції успішно зарекомендували себе в доклінічних моделях, фактично всі з більш ніж 100 клінічних випробувань з нейропротекції при глаукомі не були успішними, а тому підходи, спрямовані на захист від впливу підвищеного ВОТ, досі залишаються актуальними [5, 52].

Саме тому нашу дисертацію присвячено пошуку нових стратегій захисту ГЗН при глаукомі. Основним типом гліальних клітин в немієлінізованій ГЗН є астроцити ГЗН (рис. 1.1), які забезпечують синтез позаклітинного матриксу в процесі розвитку та протягом усього життя [53]. Крім того, АГЗН необхідні для підтримки життєздатності та фізіологічної функції ГКС. Астроцити голівки зорового нерва дуже чутливі до механічного впливу та оксидативного стресу – факторів, що ініціюють пошкодження аксона на ранній стадії патогенезу глаукоми.

За глаукоматозної ретинопатії в АГЗН ініціюються процеси реактивного астроцитозу (рис. 1.1), для яких характерні клітинна активація і міграція, ремоделінг зовнішньоклітинного матриксу та зміни в експресії генів і білків астроцитів [14]. Однією з найперших патологічних змін при

глаукомі є активація та реконструкція позаклітинного матриксу внаслідок зміни експресії генів та білків в АГЗН [13, 15, 54].

Між тим внутрішньоклітинні сигнальні шляхи в АГЗН залишаються остаточно нез'ясованими. З огляду на спеціалізовану роль АГЗН у трофічній та структурній підтримці ГЗН цілком імовірно, що їх властивості відрізняються від астроцитів мозку, головною функцією яких є гомеостатичний контроль іонного балансу та трофічна підтримка нейронів. Тому ми вважаємо, що цитопротекторні підходи, спрямовані на захист АГЗН (тобто гліопротекція), являють собою реалістичну стратегію фармацевтичного втручання в лікування глаукоми. Основною причиною зниження активності досліджень в цьому напрямку, з нашої точки зору, є недостатня кількість валідованих експериментальних платформ для тестування гліопротекторного потенціалу нових кандидатів на лікарські засоби.

### **1.6 Застосування первинної культури АГЗН для скринінгу фармацевтичних субстанцій із гліопротекторною дією**

Універсальна платформа для скринінгу фармацевтичних субстанцій з гліопротекторною дією вимагає використання відповідної клітинної культури. У багатьох дослідженнях використовують первинні культури астроцитів, отриманих від новонароджених щурів або неонатів, що може некоректно моделювати властивості клітин, оскільки глаукома є захворюванням, асоційованим з віком [55–57]. Більше того, деякі з цих клітинних культур містять значну кількість клітин інших типів, таких як олігодендроцити та перицити [55, 57], що може ускладнювати високопродуктивний скринінг потенційних гліопротекторів для лікування глаукоми. Описано первинні культури АГЗН людини, отримані з донорських тканин дорослої людини (очі трупів). Але застосування таких платформ обмежене через неможливість прямого перенесення отриманих

результатів на моделі на гризунах, на яких мають проводитись ранні доклінічні дослідження з підтвердження принципової можливості (proof-of-concept studies) та ефективності (efficacy studies) нових кандидатів на лікарський засіб для лікування глаукоми. Щоб подолати цю проблему, ми прагнули розробити протокол для первинної культури АГЗН дорослих щурів, який відповідав би вимогам високопродуктивного скринінгу потенційних гліопротекторів для лікування глаукоми.

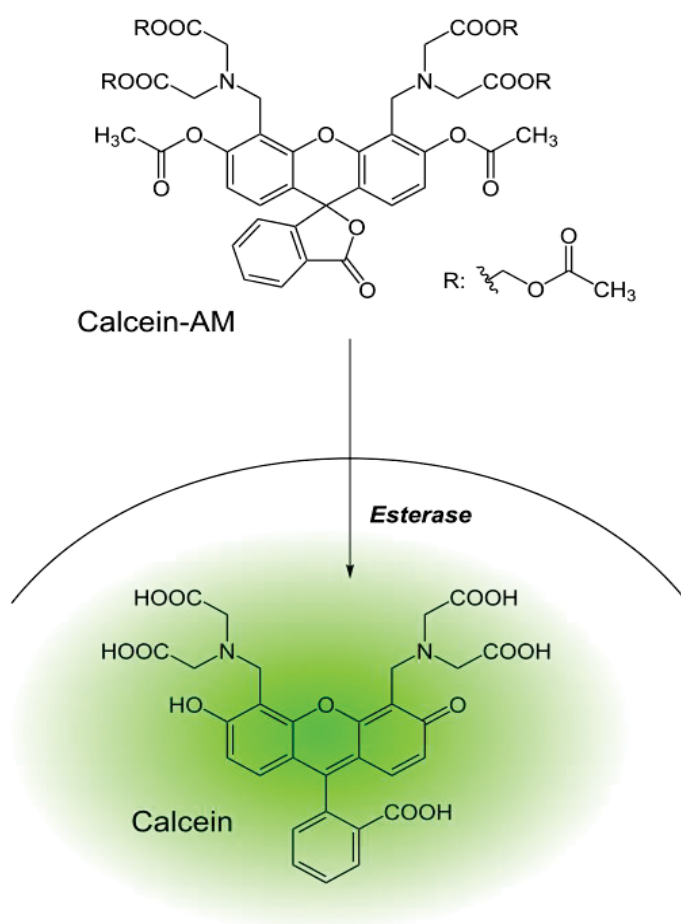
### **1.7 Оцінка життєздатності клітин як інструмент скринінгу фармацевтичних субстанцій із гліопротекторною дією**

Для скринінгу сполук широко застосовують дослідження на культурах клітин, які дозволяють визначити характер впливу, а саме: чи тестовані молекули впливають на проліферацію клітин або загибель клітин обумовлена прямою цитотоксичною дією. Культуральні дослідження також широко застосовують для оцінки зв'язування рецепторів та подій каскаду сигнальної трансдукції, які включають експресію репортерних генів, рух клітинних компонентів або контроль функції органел. Проводячи будь-яке дослідження важливо знати, скільки життєздатних клітин залишається в кінці експерименту. Існує ряд методів, які можуть бути застосовані для оцінки кількості життєздатних еукаріотичних клітин. Кілька методів оцінки життєздатності клітин було попередньо валідовано для високопродуктивного скринінгу нейропротекторних препаратів у первинних культурах нейрональних клітин [58], у тому числі метод поглинання кальцеїну-АМ та МТТ-тест.

#### **1.7.1 Метод поглинання кальцеїну-АМ**

Методи із застосуванням мембранопроникних субстратів естераз, які є різновидом тестів із виключенням барвника (dye exclusion assays), придатні як для вимірювання ферментативної активності, так і з метою

оцінки цілісності клітинних мембран. Завдяки електронейтральності молекули субстратів естераз здатні вільно дифундувати до більшості клітин. У цитоплазмі нефлуоресцентні субстрати за участю внутрішньоклітинних естераз перетворюються на флуоресцентні продукти, які за умови цілісності плазматичної мембрани утримуються всередині клітин. У дослідженнях життєздатності клітин широко застосовують субстрат естераз кальцеїн-АМ [59]. Він являє собою мембранопроникне похідне флуоресцеїну, що може дифундувати у клітини. У клітині кальцеїн-АМ гідролізується ендogenousними естеразами, перетворюючись на зелений флуоресцентний кальцеїн (рис. 1.2).



**Рис. 1.2** – Перетворення кальцеїну-АМ на кальцеїн за участю клітинних естераз. Yikrazuul (2014). *Aufnahme von Calcein-AM in die Zelle führt zu Bildung von Calcein (grüne Fluoreszenz)* [Digital image].

Адаптовано з Wikimedia commons



Флуоресцентний сигнал може бути виміряний з відповідним набором світлофільтрів (довжина хвилі 485 нм для збудження / 530 нм для випромінювання). Важливо, що після відщеплення естеразами ацетоксиметильної групи молекула кальцеїну більше не може дифундувати з клітини та залишається локалізованою в цитоплазмі. Те, що кальцеїн-АМ здатний входити лише в інтактні клітини, робить його цінним інструментом, який дозволяє відрізнити життєздатні клітини від загиблих. Таким чином, отриманий флуоресцентний сигнал прямо пропорційний загальній кількості живих клітин у певному зразку [60].

Аналіз токсичності із застосуванням методу поглинання кальцеїну-АМ може бути автоматизований та виконуватись методом проточної цитометрії. Але істотним недоліком для широкомасштабної оцінки життєздатності клітин є токсичність кальцеїну-АМ для окремих клітинних ліній, яка спричиняє його викидання з клітин. Крім того, стадії відмивки в методі поглинання кальцеїну-АМ відрізняються від протоколу відмивки для ДНК-барвників, що є найбільшим недоліком його використання.

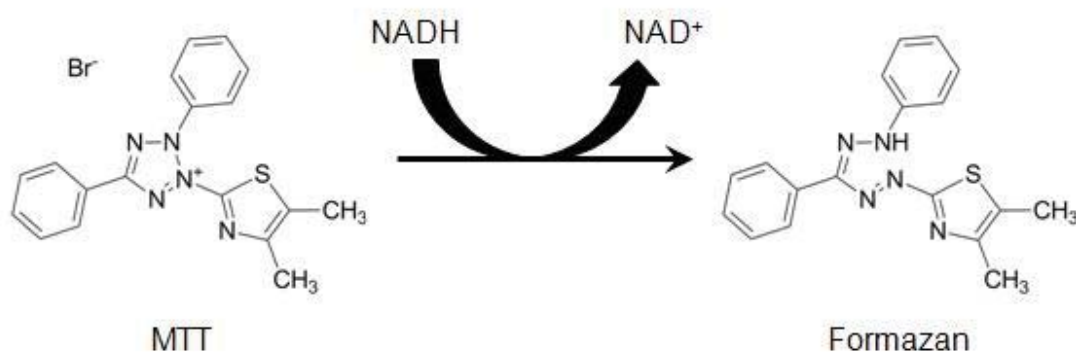
### **1.7.2 МТТ-тест**

Метод відновлення МТТ був першим гомогенним аналізом, розробленим для 96-лункового формату оцінки життєздатності клітин, який виявився придатним для високопродуктивного скринінгу [61]. Запропонована технологія стала широко використовуваною, і МТТ-тест наразі залишається популярним у наукових лабораторіях, про що свідчать тисячі опублікованих статей. Субстрат для МТТ-тесту готують у збалансованому фізіологічному розчині, додають до клітин у культурі, зазвичай у кінцевій концентрації 0,2–0,5 мг/мл, та інкубують протягом 1–4 год. Кількість формагану (яку вважають прямо пропорційною кількості життєздатних клітин) вимірюють, реєструючи зміни оптичної густини при 570 нм за допомогою планшетного спектрофотометра. Іноді

використовують референтну довжину хвилі 630 нм, але для більшості випадків це не обов'язково [62].

Життєздатні клітини з активним метаболізмом перетворюють МТТ у формазан – фіолетовий продукт з максимумом поглинання близько 570 нм (рис. 1.3). Коли клітини вмирають, вони втрачають здатність перетворювати МТТ у формазан, таким чином, утворення забарвлення служить зручним маркером життєздатності клітин. Точний клітинний механізм відновлення МТТ у формазан є недостатньо зрозумілим, але, ймовірно, включає реакцію з NADH або іншими переносниками електронів, які переносять електрони до МТТ [63]. У численних публікаціях згадується припущення, що МТТ-тест вимірює мітохондріальну активність, яке ґрунтується на опублікованій раніше гіпотезі щодо участі специфічних мітохондріальних ферментів у цій реакції [62, 64–66].

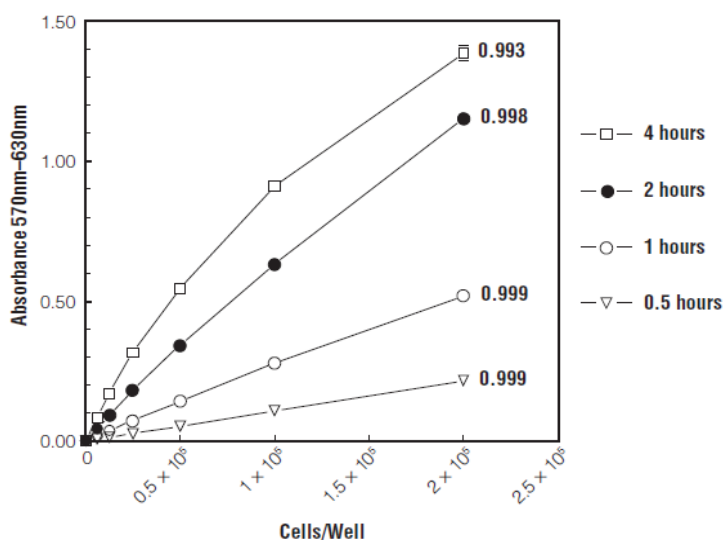
Утворений формазан накопичується як нерозчинний осад всередині клітин, а також відкладається біля поверхні клітини та в культуральному середовищі. Перед вимірюванням оптичної густини формазан необхідно солюбілізувати. Використовують різні способи для солюбілізації формазану, стабілізації кольору, уникнення випаровування та зменшення похибки через оптичну активність фенолового червоного або інших компонентів живильного середовища [67–69]. Відомі способи солюбілізації з використанням підкисленого ізопропанолу, ДМСО (диметилсульфоксид), диметилформаміду, SDS (натрію додецилсульфат) та комбінацій детергента з органічним розчинником [61, 67–69]. Підкислення розчину для солюбілізації сприяє зміні кольору фенолового червоного на жовтий, що зменшує похибку при вимірюванні абсорбції. Можна підібрати рН розчину для солюбілізації таким чином, щоб забезпечити максимальну абсорбцію та підвищити чутливість методу [70]. Також для підвищення чутливості методу розроблюють модифікації методу з використанням інших близьких за структурою тетразолієвих барвників.



**Рис. 1.3** – Структура МТТ та формазау [62]

Значення абсорбції залежить від декількох параметрів, а саме: концентрації МТТ, тривалості інкубаційного періоду, кількості життєздатних клітин та їхньої метаболічної активності. Усі ці параметри слід враховувати при оптимізації умов аналізу, щоб отримати достатню для виявлення порівняно з фоном кількість формазау [62].

Перетворення МТТ на формазан клітинами в культурі залежить від часу (рис. 1.4) [62].

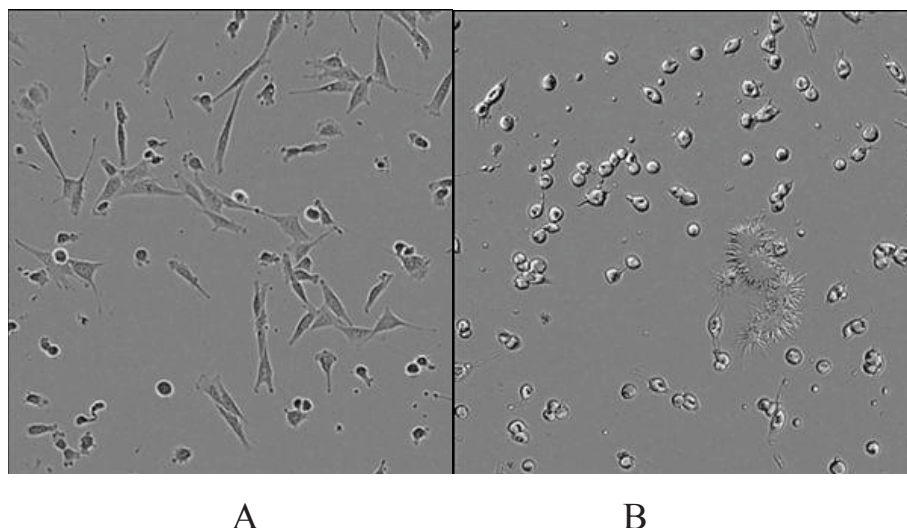


**Рис. 1.4** – Пряма кореляція абсорбції формазау з кількістю клітин гібридами В9 та залежність збільшення абсорбції від часу [62]

Триваліший час інкубації сприятиме збільшенню забарвлення та підвищенню чутливості до точки; однак час інкубації обмежений через цитотоксичну природу реагентів у тесті, які використовують енергію клітини (відновлювальні еквіваленти, такі як NADH). Для популяції клітин у фазі експоненційного росту кількість утвореного формазану зазвичай пропорційна кількості метаболічно активних життєздатних клітин, як це показано на рис. 1.4.

Умови культивування, які впливають на метаболізм клітин, швидше за все будуть впливати і на швидкість відновлення МТТ у формазан. Наприклад, коли прикріплені клітини в культурі досягають конфлуентності й ріст пригнічуються внаслідок контактного інгібування, обмін речовин може сповільнюватися і кількість відновлюваного МТТ у перерахунку на клітину буде меншою. Така ситуація призведе до втрати лінійності між абсорбцією та кількістю клітин. Інші несприятливі умови культивування, такі як зміна рН або виснаження есенціальних поживних речовин, таких як глюкоза, можуть також впливати на здатність клітин відновлювати МТТ [62].

Після додавання МТТ можна спостерігати різку зміну морфології деяких типів клітин з часом, що свідчить про фізіологічні зміни (рис. 1.5) [62]. Токсичність МТТ швидше за все пов'язана з концентрацією, в якій його додавали до клітин. Оптимізація концентрації може сприяти зниженню токсичності. З огляду на цитотоксичну природу МТТ метод аналізу повинен розглядатися як аналіз за кінцевою точкою.



**Рис. 1.5** – Зміна морфології клітин NIH3T3 після впливу МТТ (0,5 мг/мл). Панель А показує поле з клітинами, сфотографоване одразу після додавання розчину МТТ. Панель В показує те саме поле з клітинами, сфотографоване через 4 год експозиції з МТТ: видно зміну морфології клітин та появу кристалів формазау [62]

Комерційні набори, що містять розчини МТТ та реагент для сольобілізації, а також порошок реагенту МТТ, можна придбати у декількох постачальників. Наприклад:

- CellTiter 96<sup>®</sup> Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Promega Corporation;
- Cell Growth Determination Kit, MTT based. Sigma-Aldrich;
- MTT Cell Growth Assay Kit. Millipore;
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT Powder). Sigma-Aldrich.

Концентрація розчину МТТ та реагент для сольобілізації різняться у різних постачальників. Значення фотометричного сигналу формазау буде залежати від різноманітних параметрів, включаючи тип клітин, кількість клітин на лунку, середовище культивування та ін. Хоча комерційно доступні набори широко застосовують для великої кількості типів клітин та умов

аналізу, для досягнення оптимальних характеристик, можливо, доведеться підбирати концентрацію МТТ і тип розчину для солюбілізації [62].

Тести для кількісної оцінки життєздатності клітин, які в багатьох випадках добре зарекомендували себе як для клітинних ліній, так і для первинних культур нейронів, не були оптимізовані та валідовані для АГЗН або астроцитів взагалі.

### **1.7.3 Кількісне визначення лактатдегідрогенази**

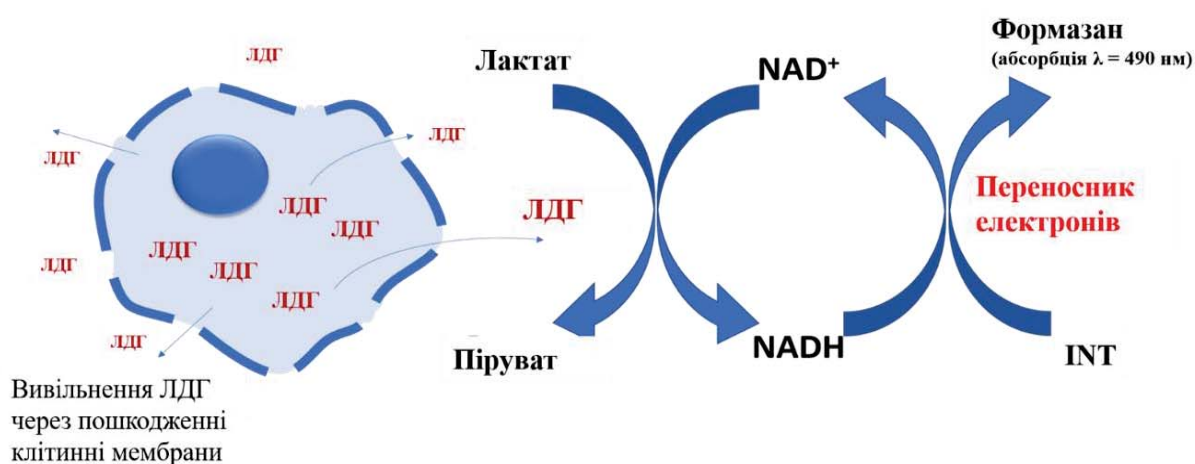
Іншим прикладом аналізу життєздатності, який ґрунтується на контролі метаболічної функції, є кількісне визначення ЛДГ. Кількісне визначення ЛДГ – це широко застосовний метод аналізу життєздатності клітин, який забезпечує швидку, надійну та відтворювану інформацію про потенційну токсичність експериментальних сполук та потенційних кандидатів у фармацевтичні препарати [71–74]. Метод було вперше описано більш ніж 50 років тому, і з того часу його було значно оптимізовано та адаптовано для автоматизації [71, 75–77].

У разі пошкодження клітинної мембрани ЛДГ вивільняється з цитоплазми у позаклітинне середовище, що й використовується для непрямого визначення кількості життєздатних клітин. Лактатдегідрогеназа каталізує перетворення лактату на піруват з утворенням NADH. Потім NADH може бути використаний для відновлення нефлуоресцентної сполуки до флуоресцентної. Наприклад, в CytoTox 96 Assay (Promega) використовується реакція NADH-опосередкованого перетворення фіолетового йодонітетразолій хлориду (INT) на червоний формазан (рис. 1.6) за участю діафрази. Формазан розчинний у воді й може бути легко виявлений за допомогою фотометрії через вимірювання абсорбції при 490 нм [78].

Флуоресценція пропорційна кількості вивільненого ЛДГ. Комерційні набори, які ґрунтуються на визначенні ЛДГ, від Promega та Molecular Probes,

використовувались для оцінки життєздатності культур трофобластів. Хоча методи на основі визначення ЛДГ можна застосовувати у комбінації з іншими методами оцінки вивільнення ферментів, їх низька чутливість обмежує застосування. Крім того, ЛДГ має порівняно короткий напівперіод існування.

На сьогодні існує чимало комерційних наборів на основі оцінки вивільнення ЛДГ, однак ці комерційні рішення мають численні недоліки, зокрема високу вартість (320 \$ для комплекту Promega), обмежену розширюваність і, що найважливіше, закриту формулу та технології. Але ж добре відомо, що окремі хімічні речовини можуть інактивувати ЛДГ або впливати на вивільнення ЛДГ клітинами [79], тому протоколи повинні мають бути ретельно розробленими і перевіреними.



**Рис. 1.6** – Вивільнення ЛДГ із пошкоджених клітин вимірюється в реакції за участю переносника електронів (MPMS – 1-метокси-феназин метосульфат) при забезпеченні лактатом,  $\text{NAD}^+$  та INT як субстратами.

Кількість утвореного червоного формазану пропорційна кількості виділеного ЛДГ, а отже, кількості лізованих клітин

Вищезазначені аналізи життєздатності клітин, які в багатьох випадках добре зарекомендували себе як для клітинних ліній, так і для первинних культур нейрональних клітин, не були оптимізовані та валідовані для АГЗН

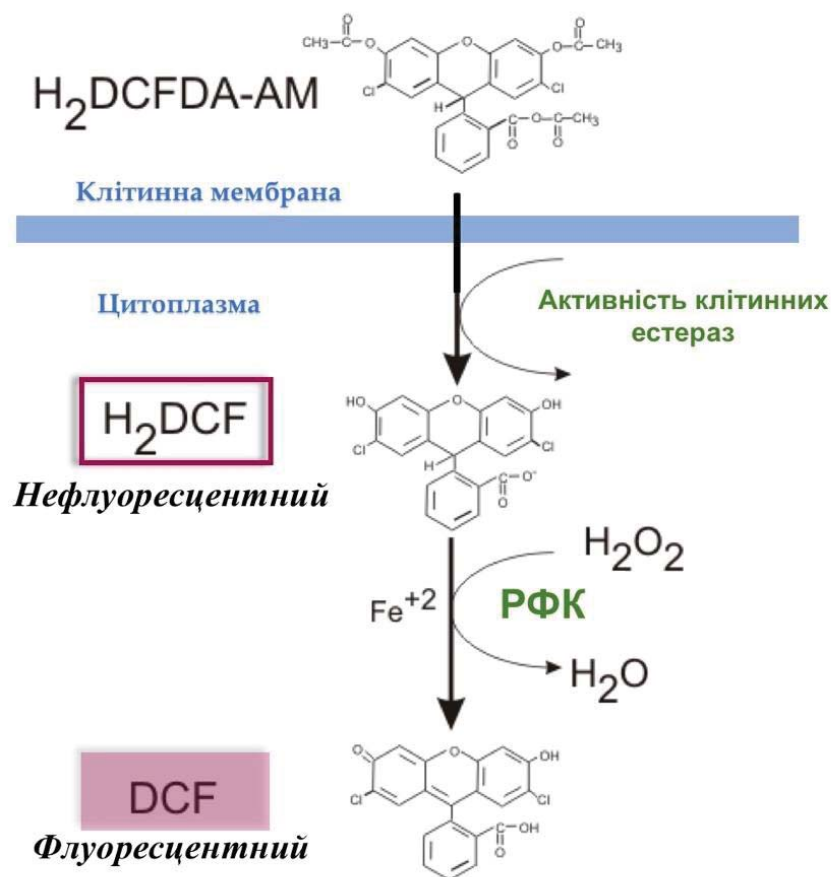


або астроцитів взагалі, тому розробка платформи для високопродуктивного скринінгу гліопротекторів для лікування глаукоми потребує оптимізації та перевірки цих аналізів життєздатності для первинної культури АГЗН дорослих щурів.

### **1.8 Оцінка рівня оксидативного стресу як інструмент скринінгу гліопротекторних сполук**

Враховуючи суттєвий вплив оксидативного стресу при глаукомній ретинопатії, скринінг препаратів для гліопротекції має бути зосереджений, насамперед, на оцінці здатності потенційних гліопротекторів знижувати рівень РФК в уражених астроцитах. Для цього наявні методики вимірювання рівня РФК у клітинах мають бути оптимізовані для використання в культурі АГЗН.

Широко відомим є метод кількісного визначення  $H_2O_2$  із застосуванням окиснення 2',7'-дихлорфлуоресцина ( $H_2DCF$ ) до 2',7'-дихлорфлуоресцеїну ( $DCF$ ). Діацетатна форма  $H_2DCFDA$  (2',7'-дихлорфлуоресциндіацет) та її ацетометилловий ефір  $H_2DCFDA-AM$  поглинаються клітинами, внутрішньоклітинні неспецифічні естерази відщеплюють від них ліпофільні групи, унаслідок чого утворюються заряджені сполуки, які, як вважається, залишаються захопленими всередині клітини. Активні форми кисню окислюють  $H_2DCF$  до флуоресцентного  $DCF$  (рис. 1.7). Флуоресценцію  $DCF$  можна вимірювати при довжині хвиль 498 нм для збудження та 522 нм для випромінювання.



**Рис. 1.7** – Утворення флуоресцентної сполуки DCF за участі РФК

Спочатку DCF вважався специфічним для пероксиду водню, але були отримані дані, що інші РФК, такі як нітрат-іон та хлорнуватиста кислота, також можуть окислювати H<sub>2</sub>DCF [80]. Найважливішим є те, що H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-залежне окиснення H<sub>2</sub>DCF вимагає двовалентного заліза [81]. Окрім того, оскільки H<sub>2</sub>DCF більше не є іоном, ніщо не заважає йому мігрувати з клітини та накопичуватись у середовищі, де він може вільно взаємодіяти з окисниками. Таким чином, методика з використанням DCF потенційно може бути оптимізованою для застосування в культурі АГЗН, що доповнить набір аналізів життєздатності клітин у платформі для скринінгу гліопротекторів.

## Висновки до розділу 1

Сучасні знання патогенезу глаукоми свідчать про можливість значного підвищення ефективності її лікування за допомогою гліопротекторів. Розвиток нових лікарських засобів вимагає тестування їх попередників (фармацевтичних субстанцій) на клінічно релевантних моделях, які якнайкраще відтворювали б глаукоматозний процес в очах літніх людей. Доступні джерела інформації підтверджують відсутність таких експериментальних моделей, адаптованих до клінічних умов. Це значною мірою перешкоджає скринінгу прекурсорів фармацевтичних препаратів для лікування глаукоми. Наявні методи оцінки терапевтичного впливу гліопротекторів на ГЗН мають високу вартість та трудомісткість. Проблема недосконалості цих методів є перепорою на шляху розробки нових гліопротекторів. Її вирішення потребує нових біотехнологічних рішень.

Наша робота спрямована на створення доступної, інформативної та простої системи скринінгу ефективності гліопротекторних фармакологічних субстанцій на основі вивчення фізико-хімічних і біохімічних основ життєдіяльності, закономірностей росту і розвитку клітинних культур АГЗН при глаукомі та під впливом гліопротекторних лікарських субстанцій.

**Результати, отримані у цьому розділі, опубліковано у таких працях:**

1. Kaja S. Plate reader-based cell viability assays for glioprotection using primary rat optic nerve head astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. Levy, D. H. Zaidi, A. M. Altman, S. Nawazish, J. K. Ghuman, B. C Gerdes, M. A Moore, P. Koulen // *Experimental Eye Research*. – 2015. – Vol. 138. – P. 159–166.

2. Payne A. J. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina / A. J. Payne, S. Kaja, **Y. Naumchuk**, N. Kunjukunju, P. Koulen // *Int J Mol Sci*. – 2014. – Vol. 15. – P. 1865–1886.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1 Матеріали

Для первинної культури АГЗН усі буфери та середовища було отримано від Lonza (Walkersville, MD), за винятком трипсин-ЕДТА (Media Tech Inc., Manassas, VA). Сироваткові компоненти було придбано у Gibco® (Life Technologies, Carlsbad, CA). Пластик для культур клітин було отримано від TPP® (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland; sourced from Midwest Scientific, St. Louis, MO), за винятком 96-лункових чорних планшетів із прозорим дном для вимірювання флуоресценції у DCFDA-аналізі (Nunc™; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Для імуноцитохімії та ЛДГ-аналізу 96-лункові планшети з оптичним дном також було отримано від Nunc™ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Реагенти для покриття 96-лункових планшетів з оптичним скляним дном було отримано від Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Покривні скельця (12 мм), вкриті полі-L-лізином, було придбано в BD Biosciences (San Jose, CA). Усі антитіла та барвники, що використовувались для імуноцитохімії, є комерційно доступними, їх наведено в табл. 2.1. Трет-бутилгідропероксид (tBHP), який додавали до культурального середовища для хімічної індукції оксидативного стресу, було придбано в Sigma Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Дихлорофлуоресциндіацетат (DCFDA), кальцеїн-АМ та МТТ було придбано в Life Technologies (Carlsbad, CA).

Таблиця 2.1

#### Список використаних антитіл для імуноцитохімії

Номер у каталозі	Виробник / Постачальник	Антитіло
ab416	AbCam, Cambridge, MA	Кроляче поліклональне до EAAT1
ab4674	AbCam, Cambridge, MA	Кроляче поліклональне до GFAP

Продовж. табл. 2.1

Номер у каталозі	Виробник / Постачальник	Антитіло
ab11178	AbCam, Cambridge, MA	Мишаче моноклональне до S100 $\beta$ , клон SH-B1
A-21429	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 мічене козяче антикроляче
A-21449	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 мічене козяче антикуряче
A-10667	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 мічене козяче антимишаче
D1306	Life Technologies, Carlsbad, CA	4',6-діамідино-2-феніліндол, дигідрохлорид (DAPI)
A12379	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 фалоїдин

## 2.2 Методи

### 2.2.1 Первинна культура астроцитів голівки зорового нерва щурів

Препарат оптичного нерва отримували із щурів-самців віком 9-12 місяців (Brown Norway rats). Після евтаназії оптичний нерв препарували та промивали в 35-мм плашках у крижаному 0,1 М фосфатному буфері, pH 7,4 (PBS; Lonza, Walkersville, MD). Тканину переносили на наступну плашку з 1 мл середовища для росту, що складалося з модифікованого за способом Дульбекко середовища Ігла (DMEM; Lonza, Walkersville, MD), доповненого 20 % ембріональної телячої сироватки (FBS; Gibco<sup>®</sup> Qualified; Life Technologies, Carlsbad, CA), з додаванням 100 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (обидва від Lonza, Walkersville, MD). Тканину голівки оптичного нерва з 6 очей об'єднували, а потім нарізали невеликими шматочками за допомогою нового одноразового леза. Суспензію тканини за допомогою мікропіпетки P1000 (Eppendorf North America, Hauppauge, NY) переносили в мікроцентрифужну пробірку об'ємом 5 мл (Eppendorf North America, Hauppauge, NY) для трипсинізації, яку проводили протягом 20 хв у водяній бані за 37°C у середовищі для росту з додаванням 0,1 %

трипсин / ЕДТА у збалансованому сольовому розчині Хенкса (HBSS). Під час трипсинізації тканину кожні 5 хв обережно перемішували піпетуванням за допомогою піпеткового дозатора P1000 (Eppendorf North America, Hauppauge, NY) для кращої дисоціації клітин. Після трипсинізації суспензію центрифугували на центрифугі з відкидним ротором за 500 g протягом 3 хв. Супернатант аспірували, осад ресуспендували у 1 мл середовища для росту і перемішували піпетуванням  $15 \times$  за допомогою піпеткового дозатора P1000. Клітинну суспензію потім засіювали у 6-лунковий планшет (еквівалент тканини з однієї тварини, тобто дві ГЗН на кожну лунку). Клітини контролювали за допомогою інвертованого мікроскопа (DM IL, Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL). Через 7 днів *in vitro* тканинні залишки та супернатант видаляли шляхом вакуумної аспірації та додавали свіже середовище. Далі заміну середовища виконували кожні 72 год. На 14-й день *in vitro*, після досягнення майже 90 % конfluентності, АГЗН піддавали трипсинізації (0,25 % трипсин, 2,21 мМ ЕДТА у збалансованому сольовому розчині Хенкса; MediaTech Inc., Manassas, VA) та субкультивували у флакони T25 (TPP®, Midwest Scientific, St. Louis, MO).

### 2.2.2 Імуноцитохімія та отримання зображень

Хоча астроцити й ростуть на необроблених покривних скельцях, молекулярні субстрати визначають морфологічні та функціональні властивості клітин [82–85]. Для того, щоб визначитись із можливістю виконання в перспективі експериментів із співкультивуванням АГЗН з нейрональними клітинами, такими як ГКС, які для росту та диференціації *in vitro* потребують покриття скляної підкладки субстратом, ми протестували різні покриття для покривних скелець, щоб визначити оптимальні умови росту для первинної культури АГЗН.

Клітини засіювали з густиною 2500 на лунку в комерційні, оброблені запатентованим субстратом (CC<sup>2</sup>) 96-лункові планшети з оптичним скляним

дном (Nunc™; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL або Nunc™; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) чи у 96-лункові планшети з оптичним скляним дном (Nunc™; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), в яких поверхню вкривали різними субстратами: ламініном, полі-L-лізином, полі-D-лізином або сумішшю полі-D-лізин / ламінін (всі від Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, MO). Після 48 год культивування клітини фіксували протягом 15 хв у 4 % параформальдегіді в 0,1 М PBS та обробляли флуоресцентними барвниками відповідно до рекомендацій виробника: AlexaFluor® 488 phalloidin (Life Technologies, Carlsbad, CA) у розведенні 1:50, щоб виявити актинові філаменти, та 4',6-діамідино-2-феніліндол, дихлоргідратом (DAPI; Life Technologies, Carlsbad, CA), щоб виявити ядра клітин. Візуалізацію планшетів виконували за допомогою візуалізуючого планшетного рідера Cytation3 (Biotek, Winooski, VT) з об'єктивом 63× й світлофільтрами для GFP та DAPI. Зображення отримували, використовуючи функцію мозаїчного сканування лунок програмного забезпечення Gen5 (Biotek, Winooski, VT).

Імуноцитохімічний аналіз виконували для позитивної ідентифікації клітин як астроцитів за допомогою встановлених маркерів астроцитів. Клітини мітили подвійною флуоресцентною міткою. Процедура проводили, як описано раніше [86–89]. Наводимо короткий опис методики. Астроцити голівки зорового нерва засіювали у 24-лункові планшети на круглі скляні покривні скельця діаметром 12 мм, вкриті полі-L-лізином (BD Biosciences, San Jose, CA) з густиною 7500 на лунку. Після 48 год культивування клітини промивали 500 мкл PBS та фіксували у 4 % параформальдегіді в 0,1 М PBS протягом 15 хв. Покривні скельця тричі відмивали в PBS та переміщали у вологу камеру за допомогою пінцета Dupont #5. Клітини інкубували у блокувальному розчині (1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA), 10 % сироватки віслюка, 0,5 % тритон X-100 у PBS) протягом 1 год за кімнатної температури. Блокувальний розчин видаляли шляхом вакуумної аспірації. Далі клітини інкубували протягом ночі (16 год) за 4 °C з первинними антитілами, розведеними у дилуенті для антитіл (1 % BSA, 3 % сироватки



віслюка, 0,5 % тритон X-100, 0,005 % NaN<sub>3</sub> у PBS). Усі антитіла заздалегідь були екстенсивно валідовані щодо їхнього застосування в імуноцитохімії, що відображено в табл. 2.1.

Далі покривні скельця тричі відмивали в PBS та інкубували клітини в темряві протягом 1 год за кімнатної температури із вторинними антитілами, міченими AlexaFluor<sup>®</sup>, які були розведені в дилуєнті без азиду натрію. Потім клітини обробляли іншим флуоресцентним барвником – DAPI, для маркування ядер клітин. Покривні скельця тричі послідовно відмивали в PBS, занурювали у дистильовану ультрачисту воду (18 MΩ) для видалення залишку солі, встановлювали на звичайних або матових слайдах (Mercedes Medical, Sarasota, FL) за допомогою адгезиву Aqua-Poly/Mount (Polysciences Inc., Warrington, PA). Зображення отримували за допомогою мікроскопа Leica SP5X WLL (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL).

### 2.2.3 Модель індукції оксидативного стресу

Враховуючи роль гострого та хронічного підвищення рівня оксидативного стресу при ряді нейродегенеративних захворювань, зокрема при глаукомі, ми визначали можливість застосування первинної культури АГЗН як платформи для скринінгу потенційних гліопротекторів. Ми використовували хімічно-індукований, екзогенний оксидативний стрес *in vitro* для визначення ефективності прототипного антиоксиданту Тролокса. У попередніх дослідженнях було валідовано застосування стандартного оксиданту, tBHP (Sigma Aldrich Corp.), для виконання досліджень гліопротекторів із застосуванням планшетного рідера.

Астроцити голівки зорового нерва засіювали в 96-лункові планшети (TPP, Midwest Scientific, St. Louis, MO) із густиною 7500 клітин на лунку. Через 48 год інкубації клітини протягом 5 год піддавали дії tBHP (Sigma Aldrich Corp.) у зростаючих концентраціях. Для визначення дії гліопротекторів клітини було попередньо преінкубовано із прототипним

антиоксидантом Тролоксом (100 мкМ в 0,1 % v/v етанолі; Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) або лише з 0,1 % етанолом (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO) як контролю. Нарешті, кількісно оцінювали рівень РФК, життєздатність клітин та їхню проліферацію за допомогою методів із застосуванням планшетного рідера.

#### **2.2.4 Кількісний метод оцінки РФК у клітинах із застосуванням DCFDA**

Рівень РФК після індукції оксидативного стресу tBHP кількісно визначали із застосуванням мембранопроникного флуоресцентного індикатора РФК 2',7'-дихлорофлуоресциндіацетату (DCFDA, також відомий як H2DCFDA), як було нами раніше описано для нейронів [58]. Астроцити голівки зорового нерва засіювали в 96-лункові планшети у повному середовищі, до якого додавали по 10 мкл DCFDA. Після 45-хвилинної інкубації застосовували хімічний індуктор оксидативного стресу tBHP у відповідних концентраціях, як описано вище. Потім клітини відмивали двічі по 300 мкл збалансованого розчину Хенкса (HBSS) з доданим 2 мМ CaCl<sub>2</sub>. Флуоресценцію вимірювали за допомогою мультимодального планшетного рідера (Synergy H1; Biotek, Winooski, VT) за наступними налаштуваннями: довжина хвилі збудження  $\lambda = 490$  нм, довжина хвилі емісії  $\lambda = 525$  нм, 15 вимірювань кожної лунки з автоматичним обрахунком. Для контролю використовували розчинник (0 мкМ tBHP; відсутня індукція оксидативного стресу).

#### **2.2.5 Оцінка життєздатності клітин методом поглинання кальцеїну-АМ**

Кальцеїновий тест виконували, як описано раніше для первинної культури кортикальних нейронів [58]. Надаємо короткий опис методу. Лунки з клітинами у 96-лункових планшетах заповнювали 5 мкМ розчину

кальцеїну-АМ у середовищі для росту, який готували з 5 мМ стокового розчину в ДМСО (Life Technologies, Carlsbad, CA), та інкубували планшети протягом 1 год за 37 °C, 5 % концентрації CO<sub>2</sub> та 95 % вологості. Після цього клітини двічі відмивали PBS. Флуоресцентні зображення АГЗН отримували за допомогою широкопольного мікроскопа DM-IL (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL), оснащеного метал-галогеновим джерелом освітлення CL2000 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL) та камерою MicroPublisher (QImaging, Surrey, BC).

### 2.2.6 МТТ-тест

МТТ-тест виконували, як описано раніше для культури астрогліальних клітин, клітин НТ-22 та первинної культури кортикальних нейронів [58, 86, 89]. Надаємо короткий опис методу. Культуральний супернатант аспірували та заміщували 100 мкл 1,2 мМ МТТ в HBSS з кальцієм та магнієм (Lonza, Walkersville, MD) із додаванням 10 мМ 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазинетансульфоїкислоти (HEPES) при рН 7,3. Планшети інкубували в термостаті за 37 °C близько 2 год. Середовище видаляли шляхом аспірації та проводили лізис клітин у 100 мкл ДМСО при м'якому струшуванні. Перетворення МТТ кількісно оцінювали фотометричним методом, вимірюючи поглинання за 570 нм (OD<sub>570</sub>) за допомогою планшетного рідера Synergy H1 (Biotek).

Дані експортували до Microsoft Excel (Microsoft Corp.) для обробки та бланкували відносно колонки з лунками, в яких не містилося ані tBHP, ані МТТ. Дані було нормалізовано відносно контрольних умов (0 мкМ tBHP, але присутній МТТ). Значення показника для одиночних лунок зі значними відхиленнями виключались з масиву даних для певної концентрації tBHP (колонка з 8 лунок). У середньому на один 96-лунковий планшет було виключено 2 точки; максимальна кількість виключених точок на планшет становила 5 лунок. Припускаючи гауссовий розподіл даних, ми виключали будь-які точки за межами двох стандартних відхилень від середнього по

колонці. Нормалізовані дані було згруповано відповідно до умов попередньої обробки та експортовано у програмне забезпечення Prism (GraphPad) для статистичного аналізу і побудови графіків. Для визначення середніх значень  $IC_{50}$  для tBHP для кожного варіанта попередньої обробки (контроль, розчинник або Тролокс) був проведений нелінійний регресійний аналіз з використанням 4-параметричного логістичного рівняння з різним нахилом Хілла окремо для кожного біологічного повтору (96-лунковий планшет). Дані було проаналізовано з використанням двостороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з постхок поправкою Бонфероні, з урахуванням умов попередньої обробки (контроль, розчинник або Тролокс) та концентрації tBHP як змінних. Статистичну значущість було визначено як  $p < 0,05$ .

### 2.2.7 Кількісна оцінка загибелі клітин

Ми оптимізували для АГЗН спеціальний метод кількісної оцінки вивільнення ЛДГ на основі раніше розробленого та валідованого протоколу для дослідження гліопротекторів у культурі клітин астрогліоми C6 [89]. Після 5 год експозиції клітин з tBHP, 50 мкл культурального супернатанта переносили в нестерильні прозорі 96-лункові планшети (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Додавали 50 мкл буфера для аналізу (2 мкМ INT, 3,2 мМ  $\beta$ -нікотинамід аденін динуклеотид натрієва сіль, 160 мМ лактат літію, 7,5 мкМ MPMS в 0,2 М Трис-HCl, pH 8,2).

Планшети інкубували в темряві за кімнатної температури протягом 1 год. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 1 М оцтової кислоти. Вивільнення ЛДГ кількісно оцінювали фотометричним методом, вимірюючи поглинання за 490 нм ( $OD_{490}$ ) за допомогою планшетного рідера Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT). Дані експортували до Microsoft Excel (Microsoft Corp.) для обробки та нормалізували відносно контролю на розчинник (0 мкМ tBHP). Аналіз даних виконували аналогічно аналізу, описаному для МТТ-тесту.

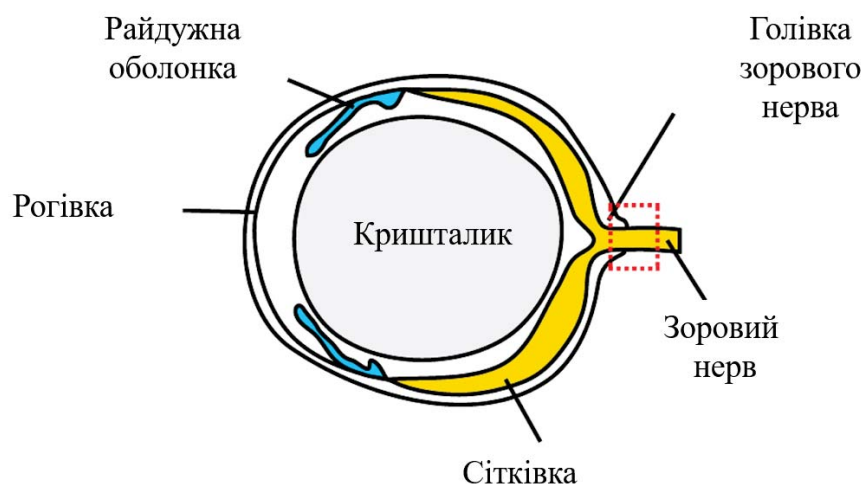
## РОЗДІЛ 3

### ВИДІЛЕННЯ АСТРОЦИТІВ ГОЛІВКИ ЗОРОВОГО НЕРВА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

#### 3.1 Виділення астроцитів голівки зорового нерва та отримання первинної культури

Першим кроком розробки платформи для високопродуктивного скринінгу фармацевтичних препаратів із гліопротекторною дією для лікування глаукоми стала розробка нової методики культивування АГЗН. Існує багато протоколів, що використовують клітини, отримані з ранньої постнатальної тканини. Незважаючи на легкість культивування, ці клітини мають незрілий фенотип та потребують диференціювання *in vitro*. Оскільки кінцевою метою наших досліджень було використання культури клітин як інструменту для скринінгу нових препаратів для лікування глаукоми, неодмінною умовою стала здатність клітин імітувати властивості дорослих астроцитів. Недоліком використання астроцитів ЗН дорослих людей є велика варіабельність клітин, отриманих від різних людей. Через це можна отримати суперечливі результати, які важко інтерпретувати під час проведення скринінгу фармацевтичних субстанцій. Тому ми вирішили використовувати дорослих (9–12 місяців) коричневих норвезьких щурів (*Rattus norvegicus*) – звичайний пігментований штам, який часто використовується для дослідження глаукоми.

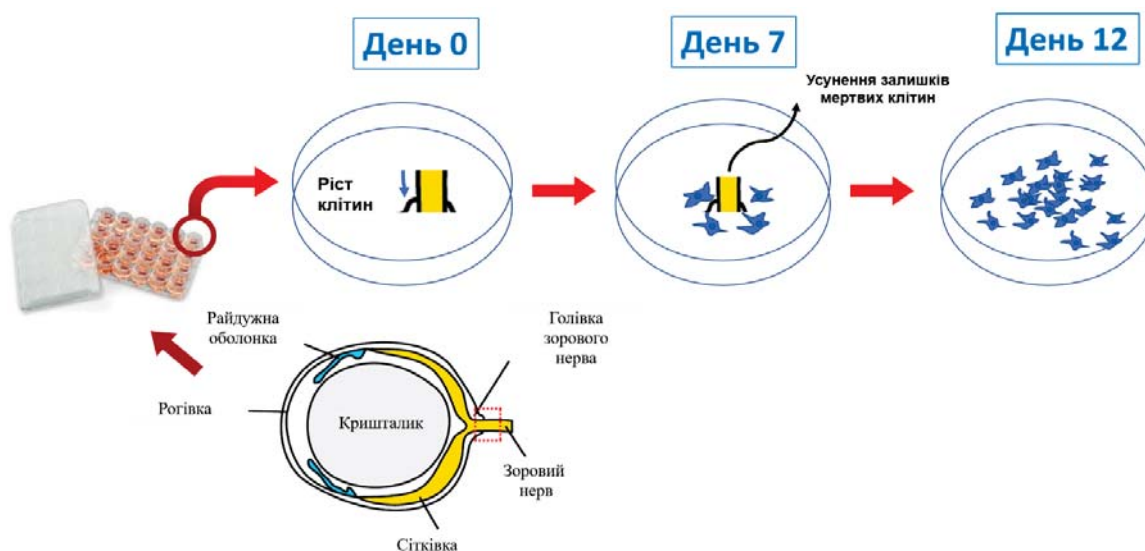
Для досягнення одношарової культури первинних АГЗН ми взяли до уваги, що астроцити – це клітини з високою міграційною та проліферативною активністю. Тканину ГЗН (рис. 3.1) разом із частиною (приблизно 2 мм) приєднаного зорового нерва виділяли з 6 очей та нарізали невеликими шматочками.



**Рис. 3.1** – Схематичне зображення організації ока. Голівку зорового нерва, яку використовують для отримання культури АГЗН, виділено червоним пунктиром

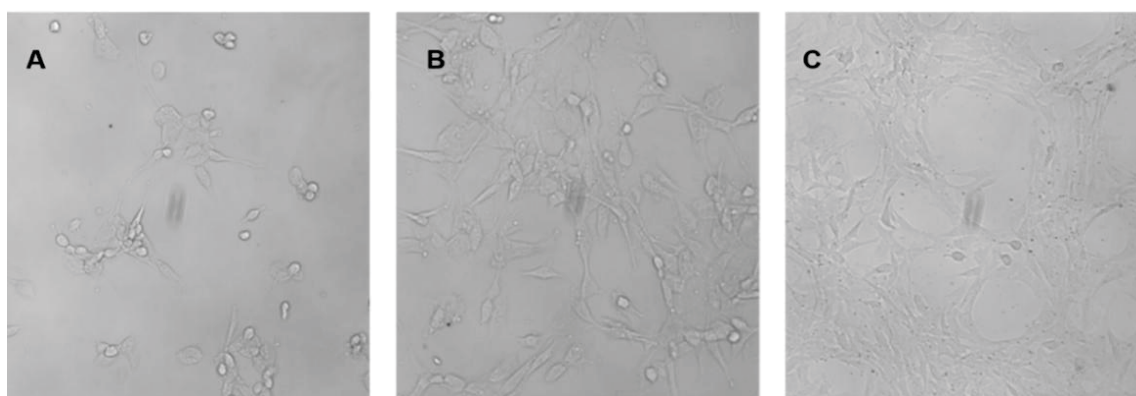
Було вжито запобіжних заходів, щоб не пошкодити нейрони та інші типи клітин сітківки при препаруванні. Тканину швидко промивали в етанолі для дезінфекції, а потім поміщали в одну лунку 24-лункового планшета в середовищі DMEM, доповненому 20 % ембріональної телячої сироватки (FBS), 100 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину. Отриману тканинну суспензію піддавали трипсинізації у збалансованому сольовому розчині Хенкса (HBSS) з додаванням 0,1 % трипсин / EDTA при 37° C протягом 20 хв на водяній бані при обережному перемішуванні піпетуванням кожні 5 хв. Після трипсинізації суспензію центрифугували на центрифугі з бакет-ротором при 500 g протягом 3 хв. Супернатант аспірували, осад ресуспендували у 1 мл середовища для росту та перемішували піпетуванням. Клітинну суспензію засіювали у 6-лунковий планшет (еквівалент тканини з однієї тварини, тобто дві ГЗН на кожну лунку). Клітини контролювали за допомогою інвертованого мікроскопа (рис. 3.2).





**Рис. 3.2** – Загальна блок-схема протоколу отримання первинної культури АГЗН щура

Приблизно через 7 днів тканинні залишки та середовище видаляли шляхом вакуумної аспірації та додавали свіже живильне середовище, оптимізоване, як буде описано в наступному підрозділі. Після 12-го дня культивування при конфлуентності приблизно 60–70 % АГЗН піддавали трипсинізації (0,25 % трипсин з ЕДТА) та субкультивували у флакони при коефіцієнті субкультивування приблизно 1:5 (рис. 3.3).



**Рис. 3.3** – Репрезентативні зображення культури АГЗН після 7 (А) і 12 днів (В) *in vitro*, а також після 5 днів культивування 2-го пасажу (С).

Шкала масштабу – 100 мкм



### 3.2 Оптимізація складу середовища для культивування первинної культури АГЗН

Частиною протоколу отримання первинної культури АГЗН стала оптимізація складу середовища для культивування з метою створення оптимальних умов росту та проліферації АГЗН. Для культивування АГЗН могло бути використане одне з комерційних середовищ: DMEM, RPMI 1640, Ham's F12, Neurobasal або Neurobasal A. Ідеальне середовище повинно сприяти росту та проліферації АГЗН, але при цьому не підтримувати ріст інших типів клітин, включаючи нейрони, олігодендроцити та перицити. Для оцінювання ефективності росту та проліферації АГЗН у кожному середовищі ми встановили таку шкалу градації: «–» – клітини не мали жодних ознак росту та проліферації; «+» – клітини були здатні до росту і поділу, але не проліферували; «++» – клітини росли та виявляли деяку проліферацію, але період подвоєння перевищував 36 год; «+++» – клітини продемонстрували бажану швидкість росту та проліферації з подвоєнням швидшим, ніж за 36 год.

Для сприяння росту та проліферації тканини середовище для культивування повинно містити всі необхідні поживні речовини, включаючи амінокислоти, вітаміни, солі та фактори росту. Іншими критичними факторами є рН середовища, буферні властивості та осмоляльність. Амінокислоти визначаються як замінні або незамінні залежно від того, чи можна їх синтезувати в організмі. Проте, крім незамінних амінокислот (тих, які не синтезуються *in vivo*) клітинні культури потребують додавання цистеїну, аргініну, глютаміну та тирозину. Глутамін потрібний більшості клітин як джерело енергії та вуглецю, хоча деякі клітинні лінії використовують глютамат. Глутамін нестійкий у живильному середовищі, період його напіврозпаду становить 3–5 діб при 37°C, до того ж він утворює токсичний аміак як побічний продукт. Тому деякі типи середовищ містять аланіл-глутамін дипептид (Glutamax, Life Technologies).

Він є стабільнішим та більш біодоступним завдяки дії дипептидази. Середовище Ігла містить лише водорозчинні вітаміни (група В, холін, фолієва кислота, інозитол і нікотинамід) і не містить біотину; інші необхідні компоненти, очевидно, мають бути отримані із сироватки. Біотин присутній у більш складних середовищах, зокрема у композиційних сироватках [90].

Сольова композиція є основним фактором, що забезпечує осмоляльність середовища. Вона включає  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  та  $\text{HCO}_3^-$ . Для деяких клітинних ліній двовалентні катіони, насамперед  $\text{Ca}^{2+}$ , необхідні для молекул адгезії клітин, таких як кадгерини, які сприяють прикріпленню до поверхні. Також  $\text{Ca}^{2+}$  є важливою сигнальною молекулою, яка включається в різноманітні сигнальні шляхи. Концентрація кальцію може бути визначальною для проліферації або диференціювання клітин. Інші іони, такі як  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Cl}^-$ , регулюють клітинний мембранний потенціал, тоді як  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  та  $\text{HCO}_3^-$  відіграють роль у позаклітинному матриксі та виступають як регулятори внутрішньоклітинного заряду. Як джерело вуглецю та енергії більшість середовищ для культивування містять глюкозу. Глюкоза метаболізується, в основному, шляхом гліколізу, з утворенням пірувату, який може бути перетворений на лактат чи ацетоацетат або входити до циклу лимонної кислоти та окиснюватись з утворенням  $\text{CO}_2$  і води [90].

Модифіковані за способом Дульбекко середовища Ігла (DMEM) містять високу концентрацію незамінних амінокислот, вітамінів і солей, необхідних для нарощування клітин або росту клітин за більш високої щільності. Ми перевірили різні марки середовищ DMEM на їхню здатність підтримувати ріст нашої культури клітин АГЗН. Комерційні DMEM-середовища варіюють за рівнем хлориду натрію та глюкози. Деякі марки середовища доповнені L-глутаміном, тоді як в інших використовують L-аланіл-L-глутамін дипептид. Деякі бренди як додаткове джерело вуглецю містять піруват натрію. Марки середовищ DMEM виробництва CORNING за каталожними номерами 10-027 та 15-018 містять HEPES (5958 мг/л)

як буферну систему. Нарешті, марка 17-204 не включає сірковмісних амінокислот L-цистин (окиснена форма L-цистеїну) та L-метіонін. Усі марки середовищ DMEM виробництва CORNING, які ми використовували для оптимізації, наведено в табл. 3.1 *а* та *б* із зазначенням їх складу.

Таблиця 3.1 (*а*)

**Доступні середовища DMEM для культивування первинних АГЗН**

<i>Номер за каталогом</i>	<i>10-013 (+)</i>	<i>10-014 (-)</i>	<i>10-017 (++)</i>	<i>10-027 (++)</i>	<i>10-101 (+)</i>	<i>10-102 (++)</i>
<i>Опис</i>	<i>Рідина, 1×</i>	<i>Рідина, 1×</i>	<i>Рідина, 1×</i>	<i>Рідина, 1×</i>	<i>Рідина, 1×</i>	<i>Рідина, 1×</i>
<i>Одиниці</i>	<i>мг/л</i>	<i>мг/л</i>	<i>мг/л</i>	<i>мг/л</i>	<i>мг/л</i>	<i>мг/л</i>
<b>Компоненти</b>						
<b>Неорганічні солі</b>						
CaCl <sub>2</sub> (безводний)	200	200	200	200	200	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
KCl	400	400	400	400	400	400
MgSO <sub>4</sub> (безводний)	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7
NaCl	6400	6400	6400	4750	6400	6400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125	125	125	125	125	125
NaHCO <sub>3</sub>	3700	3700	3700	3700	3700	3700
<b>Амінокислоти</b>						
L-Аргінін · HCl	84	84	84	84	84	84
L-Цистин · 2HCl	62,57	62,57	62,57	62,57	62,57	62,57
<b>L-Аланіл-L- глутамін</b>	0	0	0	0	869	869
<b>L-Глутамін</b>	584	584	584	584	0	0
Гліцин	30	30	30	30	30	30
L-Гістидин · HCl · H <sub>2</sub> O	42	42	42	42	42	42
L-Ізолейцин	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8
L-Лейцин	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8
L-Лізин · HCl	146,2	146,2	146,2	146,2	146,2	146,2
L-Метіонін	30	30	30	30	30	30
L-Фенілаланін	66	66	66	66	66	66
L-Серин	42	42	42	42	42	42
L-Треонін	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2
L-Триптофан	16	16	16	16	16	16

Продовж. табл. 3.1 (а)

Номер за каталогом	10-013 (+)	10-014 (-)	10-017 (++)	10-027 (++)	10-101 (+)	10-102 (++)
Опис	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×
Одиниці	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л
L-Тирозин · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	103,79	103,79	103,79	103,79	103,79	103,79
L-Валін	94	94	94	94	94	94
<b>Вітаміни</b>						
D-Кальцію пантотенат	4	4	4	4	4	4
Холін хлорид	4	4	4	4	4	4
Фолієва кислота	4	4	4	4	4	4
i-Інозитол	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
Нікотинамід	4	4	4	4	4	4
Піридоксин · HCl	4	4	4	4	4	4
Рибофлавін	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Тіамін · HCl	4	4	4	4	4	4
<b>Інші</b>						
<b>D-Глюкоза</b>	4500	1000	4500	4500	4500	4500
Феноловий червоний · Na	15	15	15	15	15	15
<b>Натрію піруват</b>	110	110	0	0	110	0
<b>HEPES</b>	0	0	0	5958	0	0

Таблиця 3.1 (б)

## Доступні середовища DMEM для культивування первинних АГЗН

Номер за каталогом	15-013 (+)	15-017 (++)	15-018 (+)	17-204 (+)	17-205 (+)	17-207 (-)
Опис	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×
Одиниці	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л
<b>Компоненти</b>						
<b>Неорганічні солі</b>						
CaCl <sub>2</sub> (безводний)	200	200	200	200	200	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
KCl	400	400	400	400	400	400

Продовж. табл. 3.1 (б)

Номер за каталогом	15-013 (+)	15-017 (++)	15-018 (+)	17-204 (+)	17-205 (+)	17-207 (-)
Опис	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×
Одиниці	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л
MgSO <sub>4</sub> (безводний)	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7	97,7
NaCl	6400	6400	6400	6400	6400	6400
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	125	125	125	125	125	125
NaHCO <sub>3</sub>	3700	3700	3700	3700	3700	3700
<b>Амінокислоти</b>						
L-Аргінін · HCl	84	84	84	84	84	84
L-Цистин · 2HCl	62,57	62,57	62,57	0	62,57	62,57
<b>L-Аланіл-L- глутамін</b>	0	0	0	0	0	0
<b>L-Глутамін</b>	0	0	0	0	0	0
Гліцин	30	30	30	30	30	30
L-Гістидин · · HCl · H <sub>2</sub> O	42	42	42	42	42	42
L-Ізолейцин	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8
L-Лейцин	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8	104,8
L-Лізин · HCl	146,2	146,2	146,2	146,2	146,2	146,2
L-Метіонін	30	30	30	0	30	30
L-Фенілаланін	66	66	66	66	66	66
L-Серин	42	42	42	42	42	42
L-Треонін	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2	95,2
L-Триптофан	16	16	16	16	16	16
L-Тирозин · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	103,79	103,79	103,79	103,79	103,79	103,79
L-Валін	94	94	94	94	94	94
<b>Вітаміни</b>						
D-Кальцію пантотенат	4	4	4	4	4	4
Холін хлорид	4	4	4	4	4	4
Фолієва кислота	4	4	4	4	4	4
i-Інозитол	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2
Нікотинамід	4	4	4	4	4	4
Піридоксин · HCl	4	4	4	4	4	4
Рибофлавін	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Тіамін · HCl	4	4	4	4	4	4

Продовж. табл. 3.1 (б)

Номер за каталогом	15-013 (+)	15-017 (++)	15-018 (+)	17-204 (+)	17-205 (+)	17-207 (-)
Опис	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×	Рідина, 1×
Одиниці	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л	мг/л
<i>Інші</i>						
<b>D-Глюкоза</b>	4500	4500	4500	4500	4500	0
<b>Феноловий червоний · Na</b>	15	15	15	15	0	15
<b>Натрію піруват</b>	110	0	110	110	110	0
<b>HEPES</b>	0	0	5958	0	0	0
<i>Додатково</i>						
L-Глутамін порошок (мг/л) або 200 мМ розчин (мл/л)	584	584	584	584	584	584
	20	20	20	20	20	20

Під час оптимізації умов культивування клітин для первинної культури АГЗН ми перевірили всі наявні марки DMEM. За нашими даними середовище, в якому міститься 584 мг/л L-глутаміну, 4500 мг/л D-глюкози та відсутній піруват натрію (каталожний номер 10-017), показало найкращий ріст і помітну проліферацію для первинної культури свіжовиділених АГЗН. Оцінювання росту і проліферації АГЗН у вибраному середовищі проводили за градацією, описаною вище.

Оптимізація показала, що культура клітин АГЗН демонструє помітний ріст і проліферацію при культивуванні в середовищі DMEM марок 10-017, 10-027, 10-102 та 15-017. За нашими даними, два компоненти були критичними для оптимального росту та проліферації АГЗН – кількість глюкози та присутність пірувату натрію. Середовища із низьким вмістом глюкози (каталожний номер 10-014 – 1000 мг/л) або за її відсутності (каталожний номер 17-207) не підтримували будь-якого росту. Крім того, середовища з наявністю пірувату натрію (110 мг/л) не підтримували проліферацію АГЗН (марки 10-013, 10-014, 10-101, 15-013, 15-018, 17-204, 17-

205). Ми не бачили істотної різниці в рості та проліферації АГЗН між різними марками середовища, якщо вони містили однакову кількість глюкози та не містили пірувату натрію, але мали різну концентрацію хлориду натрію (6400 мг/л порівняно з 4500 мг/л) або різнились за амінокислотним складом (584 мг/л L-глутаміну порівняно з 869 мг/л аланіл-L-глутаміну). Слід зазначити, що середовище DMEM марки 10-017, окрім хорошої швидкості росту та помітної проліферації, показало кращий ефект на загальну життєздатність клітин. Тому саме цю марку було використано для подальшої оптимізації.

Далі ми дослідили ріст АГЗН у середовищі Ham's F12 (табл. 3.2). Це середовище містить більш високу концентрацію амінокислот і вітамінів порівняно із середовищами DMEM.

Таблиця 3.2

**Склад середовища Ham's F12 для культивування  
первинної культури АГЗН**

<b>Компоненти, мг/л</b>	
<i><b>Неорганічні солі</b></i>	
Кальцію хлорид	33,3
Міді сульфат · 5H <sub>2</sub> O	0,0025
Заліза сульфат · 7H <sub>2</sub> O	0,834
Магнію хлорид	57,6
Калію хлорид	224
Натрію бікарбонат	1176
Натрію хлорид	7599
Натрію фосфат двозаміщений (безводний)	142,04
Цинку сульфат · 7H <sub>2</sub> O	0,863
<i><b>Амінокислоти</b></i>	
L-Аланін	9
L-Аргінін · HCl	211
L-Аспарагін · H <sub>2</sub> O	15,01
L-Аспарагінова кислота	13,3
L-Цистеїн · HCl · H <sub>2</sub> O	35,12
L-Глутамінова кислота	14,7



Продовж. табл. 3.2

L-Глутамін	146
Гліцин	7,51
L-Гістидин · 3HCl · H <sub>2</sub> O	20,96
L-Ізолейцин	3,94
L-Лейцин	13,1
L-Лізін · HCl	36,5
L-Метіонін	4,48
L-Фенілаланін	4,96
L-Пролін	34,5
L-Серин	10,5
L-Треонін	11,9
L-Триптофан	2,04
L-Тирозин · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	7,78
L-Валін	11,7
<b>Вітаміни</b>	
D-Біотин	0,0073
Холіну хлорид	13,96
Фолієва кислота	1,32
<b>Компоненти, мг/л</b>	
Міо-інозитол	18,02
Нікотинамід	0,037
D-Пантотенова кислота (гемікальцієва сіль)	0,48
Піридоксин · HCl	0,062
Рибофлавін	0,038
Тіамін · HCl	0,34
Вітамін B <sub>12</sub>	1,36
<b>Інші</b>	
D-Глюкоза	1802
Гіпоксантин	4,77
Лінолева кислота	0,088
Феноловий червоний · Na	1,3
Путресцин · HCl	0,161
Піруват · Na	110
Тіоктова (α-ліпоєва) кислота	0,21
Тимідин	0,73
<b>Фізико-хімічні показники</b>	
pH	7,2±0,2
Осмоляльність (мОсм/кг)	290±30

Виділена нами клітинна культура АГЗН продемонструвала помірний ріст, але не показала значної проліферації у середовищі Ham's F12. Можна припустити, що вміст глюкози в середовищі Ham's F12 (1802 мг/л) недостатньо високий, щоб забезпечити оптимальні умови для проліферації. Однак ми не можемо виключити вплив інших компонентів середовища.

При тестуванні середовищ RPMI 1640 (табл. 3.3) ми отримали подібні результати. Середовище RPMI 1640 містить 2000 мг/л глюкози, що може бути достатнім для належної проліферації клітин АГЗН.

Таблиця 3.3

**Склад середовища RPMI 1640 для культивування  
первинної культури АГЗН**

<b>Компоненти, мг/л</b>	
<i><b>Неорганічні солі</b></i>	
Кальцію нітрат · 4H <sub>2</sub> O	100
Магнію сульфат (безводний)	48,84
Калію хлорид	400
Натрію бікарбонат	1000
Натрію хлорид	6400
Натрію фосфат двозаміщений (безводний)	800
<b>Компоненти, мг/л</b>	
<i><b>Амінокислоти</b></i>	
L-Аргінін	200
L-Аспарагін (безводний)	50
L-Аспарагінова кислота	20
L-Цистин · 2HCl	65,2
L-Глутамінова кислота	20
Гліцин	10
L-Гістидин	15
Гідроксил-L-пролін	20
L-Ізолейцин	50
L-Лейцин	50
L-Лізин · HCl	40
L-Метіонін	15
L-Фенілаланін	15
L-Пролін	20

Продовж. табл. 3.3

L-Серин	30
L-Треонін	20
L-Триптофан	5
L-Тирозин · 2Na · 2H <sub>2</sub> O	28,83
L-Валін	20
<b><i>Вітаміни</i></b>	
D-Біотин	0,2
Холіну хлорид	3
Фолієва кислота	1
Міо-інозитол	35
Нікотинамід	1
p-Амінобензойна кислота	1
D-Пантотенова кислота (гемікальцієва сіль)	0,25
Піридоксин · HCl	1
Рибофлавін	0,2
Тіамін · HCl	1
Вітамін B <sub>12</sub>	0,005
<b><i>Інші</i></b>	
D-Глюкоза	2000
Глутатіон (відновлений)	1
NEPES	4770
Феноловий червоний · Na	5,3
<b><i>Добавки</i></b>	
L-Глутамін	300

У табл. 3.3 наведено композиційний склад середовища RPMI 1640, протестованого на первинній культурі АГЗН. Наші дані дозволяють припустити, що середовище RPMI 1640 не забезпечує умов для оптимальної проліферації первинної клітинної культури АГЗН.

Нарешті, ми протестували середовища Neurobasal та Neurobasal A, склад яких було спеціально розроблено з урахуванням потреб нейрональних клітин. Ці середовища дозволяють тривалий час підтримувати нормальний фенотип і ріст нейрональних клітин в чистій популяції без необхідності астроцитів для трофічного забезпечення.

Середовища Neurobasal and Neurobasal A (табл. 3.4) мають майже однаковий склад, за винятком того, що у середовищі Neurobasal вища

концентрація NaCl для підтримки осмолярності ( $260 \pm 10$ ) мОсм. Хоча обидва середовища містять високу концентрацію глюкози (4500 мг/л) і нижчі рівні пірувату натрію (25 мг/л) порівняно з певними марками DMEM, вони підтримували ріст, але не проліферацію АГЗН.

Таблиця 3.4

**Склад середовища Neurobasal для культивування  
первинної культури АГЗН**

Компонент (мг/л)	Neurobasal (+)	Neurobasal A (+)
<i><b>Амінокислоти</b></i>		
Гліцин	30	30
L-Аланін	2	2
L-Аргінін гідрохлорид	84	84
L-Аспарагін · H <sub>2</sub> O	0,83	0,83
L-Цистеїн	31,5	31,5
L-Гістидин гідрохлорид · H <sub>2</sub> O	42	42
L-Ізолейцин	105	105
L-Лейцин	105	105
L-Лізин гідрохлорид	146	146
L-Метіонін	30	30
L-Фенілаланін	66	66
L-Пролін	7,76	7,76
L-Серин	42	42
L-Треонін	95	95
L-Триптофан	16	16
L-Тирозин	72	72
L-Валін	94	94
<i><b>Вітаміни</b></i>		
Холіну хлорид	4	4
D-Кальцію пантотенат	4	4
Фолієва кислота	4	4
Нікотинамід	4	4
Піридоксаль гідрохлорид	4	4
Рибофлавін	0,4	0,4
Тіамін гідрохлорид	4	4
Вітамін B <sub>12</sub>	0,0068	0,0068
i-Інозитол	7,2	7,2

Продовж. табл. 3.4

Компонент (мг/л)	Neurobasal (+)	Neurobasal A (+)
<i>Солі</i>		
Кальцію хлорид $\text{CaCl}_2$ (безводний)	200	200
Заліза нітрат $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,1	0,1
Магнію хлорид (безводний)	77,3	77,3
Калію хлорид $\text{KCl}$	400	400
Натрію бікарбонат $\text{NaHCO}_3$	2200	2200
Натрію хлорид $\text{NaCl}$	3000	4000
Натрію фосфат монозаміщений $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	125	125
Цинку сульфат $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,194	0,194
<i>Інші</i>		
D-Глюкоза (Декстроза)	4500	4500
HEPES	2600	2600
Феноловий червоний	8,1	8,1
Натрію піруват	25	25

У табл. 3.4 наведено склад середовищ Neurobasal та Neurobasal A, протестованих для культивування АГЗН. Наші дані дозволяють припустити, що Neurobasal і Neurobasal A не забезпечують оптимальних умов для проліферації АГЗН.

Враховуючи те, що більшість випробуваних типів середовищ підтримували ріст, але не забезпечували ефективної проліферації, ми вирішили доповнити наші середовища сироваткою. Сироватка містить фактори росту, які сприяють проліферації клітин, та фактори адгезії, що сприяють прикріпленню клітин, а також має антитриптичну активність. Сироватка також є джерелом мінералів, ліпідів і гормонів, багато з яких можуть бути зв'язані з білком. Для культивування тканин широко використовують сироватку телят (CS), FBS, кінську (дорослих коней) та сироватку людини. Найчастіше застосовують CS та FBS, зокрема, FBS використовують для більш вимогливих клітинних ліній та для клонування. Тому нами було проведено тестування середовища DMEM 10-017, Ham's F12 та RPMI з додаванням зростаючої концентрації FBS (0,1, 0,5, 1, 2, 5,

10, 15, 20 %). Для середовищ DMEM ми також оптимізували такі фактори, як наявність пірувату натрію та рівень глюкози. Ми перевірили середовища DMEM із низьким вмістом глюкози (1000 мг/л) і високим вмістом глюкози (4500 мг/л), та з додаванням 110 мг/л пірувату натрію, або без нього при збільшенні рівня FBS. Для середовищ Ham's F12 та RPMI ми перевірили лише вплив концентрації FBS. Результати оптимізації наведено в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

### Оптимізація середовищ для росту первинної культури АГЗН

Середовище	Наявність пірувату натрію	Рівень глюкози	Оцінка проліферації клітин
DMEM + 0,1 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 0,5 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 1 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 2 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 5 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 10 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 15 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 20 % FBS	наявний	низький	—
DMEM + 0,1 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 0,5 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 1 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 2 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 5 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 10 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 15 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 20 % FBS	наявний	високий	+
DMEM + 0,1 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 0,5 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 1 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 2 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 5 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 10 % FBS	відсутній	низький	—

Продовж. табл. 3.5

Середовище	Наявність пірувату натрію	Рівень глюкози	Оцінка проліферації клітин
DMEM + 15 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 20 % FBS	відсутній	низький	—
DMEM + 0,1 % FBS	відсутній	високий	++
DMEM + 0,5 % FBS	відсутній	високий	++
DMEM + 1 % FBS	відсутній	високий	++
DMEM + 2 % FBS	відсутній	високий	++
DMEM + 5 % FBS	відсутній	високий	++
DMEM + 10 % FBS	відсутній	високий	++
DMEM + 15 % FBS	відсутній	високий	+++
DMEM + 20 % FBS	відсутній	високий	+++
Ham's F12 + 5 % FBS	x	x	+
Ham's F12 + 10 % FBS	x	x	+
Ham's F12 + 20 % FBS	x	x	++
RPMI 1640 + 5 % FBS	x	x	+
RPMI 1640 + 10 % FBS	x	x	+
RPMI 1640 + 20 % FBS	x	x	++
Neurobasal	x	x	+
Neurobasal A	x	x	+

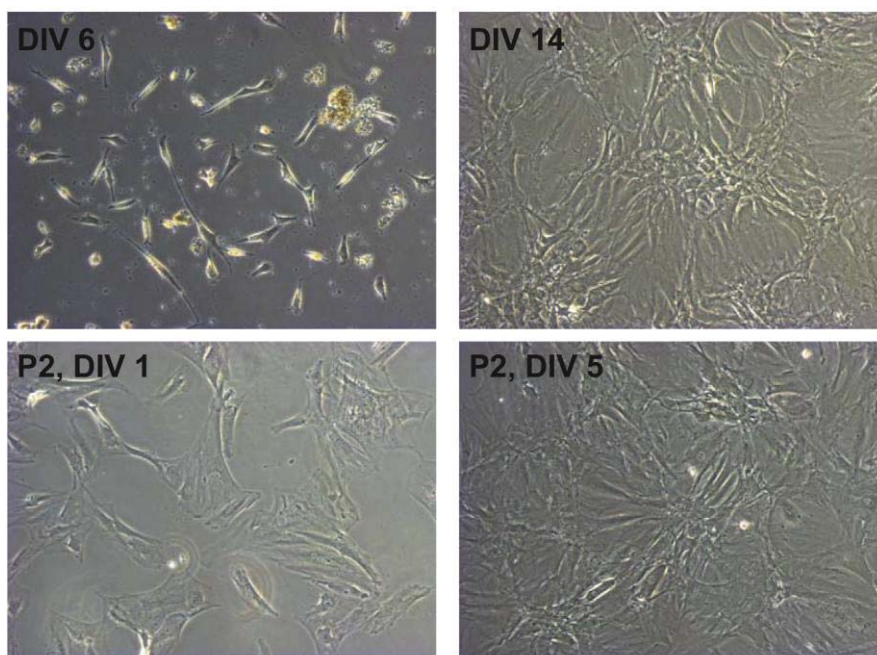
Таблиця 3.5 показує ріст та проліферацію АГЗН у вибраних оптимізованих середовищах для культивування клітин. Оцінювання росту і проліферації АГЗН проведено за градацією, описаною вище. Наші дані дозволяють припустити, що первинна культура АГЗН показує оптимальний ріст та проліферацію в середовищах DMEM з високим вмістом глюкози, без пірувату натрію, доповнених 20 % FBS.

Як було показано раніше, рівень глюкози та наявність пірувату натрію є найважливішими факторами для ефективного росту та проліферації АГЗН. До того ж, наявність 15–20 % FBS значно покращила здатність АГЗН до проліферації. При застосуванні FBS ми спостерігали також значне поліпшення життєздатності клітин. Додавання 20 % FBS покращило ріст



АГЗН також в середовищах RPMI 1640 і Ham's F12, але час подвоєння був нижчим порівняно з DMEM (високий рівень глюкози, відсутність пірувату натрію). В цілому наші дані свідчать про те, що високий рівень глюкози, відсутність пірувату натрію та добавка 20 % FBS є критичними факторами росту та проліферації АГЗН. На підставі отриманих даних ми обрали для подальших експериментів середовище DMEM з 4500 мг/л глюкози, без пірувату натрію (марка 10-107), доповнене 20 % FBS.

Культури АГЗН успішно витримували більше 10 пасажів кожні 72–96 год при коефіцієнті субкультивування 1:5 (рис. 3.4). Пасажі 4–10 ми використовували для експериментів, описаних у цій роботі.



**Рис. 3.4** – Репрезентативні зображення отриманої культури АГЗН (шкала масштабу – 100 мкм): DIV 6 – на 6 добу культивування, перед першою заміною середовища; DIV 14 – та сама культура на 14 добу культивування, після двох замін середовища; P2, DIV 1 – 2-й пасаж, зображення отримане через 24 год після субкультивування у новий культуральний флакон з коефіцієнтом 1:5; P2 DIV 5 – та сама культура (2-й пасаж), через 5 днів після пересіву

Кріоконсервація АГЗН також виявилась успішною. Астроцити голівки зорового нерва заморожували в повному середовищі з додаванням 20 % ДМСО в парі рідкого азоту. Культуру АГЗН успішно зберігали протягом двох років. Функціональної різниці АГЗН до кріоконсервації та після неї не виявлено.

Для клітин, що культивуються у прикріпленому моношарі, важливим фактором відповідного клітинного середовища є природа поверхні, на якій ростуть клітини (скло, пластик, колаген, агар, компоненти позаклітинного матриксу). У методології культури тканини цю поверхню часто називають *субстратом*, і її не слід плутати із середовищем культивування. Раніше було виявлено, що клітини прикріплюються та розпластуються на склі, яке має невеликий від'ємний заряд. Згодом було показано, що клітини можуть прикріплюватись до деяких пластмас, таких як полістирол, якщо пластик буде належним чином оброблений сильною кислотою, плазмовим розрядом або високоенергетичним іонізувальним випромінюванням. Тепер ми знаємо, що адгезія клітин опосередкована специфічними рецепторами на поверхні клітин для молекул позаклітинного матриксу. Матрикс щільно зчіплюється із зарядженим субстратом, і клітини потім зв'язуються з матриксом через специфічні рецептори. Отже, скло або пластик, кондиційований попереднім ростом клітин, часто забезпечують кращу поверхню для прикріплення, а попередня обробка субстратів складовими матриксу, такими як фібронектин, ламінін чи колаген, або похідними, такими як желатин, сприятимуть прикріпленню і проліферації більш вибагливих клітин.

Хоча астроцити й ростуть на необроблених покривних скельцях, молекулярні субстрати визначають морфологічні та функціональні властивості клітин [82–85]. Для того, щоб визначитися з можливістю виконання в перспективі експериментів із співкультивуванням АГЗН з нейрональними клітинами, такими як гангліонарні клітини сітківки, які для росту та диференціації *in vitro* потребують покриття скляної підкладки, ми

протестували різні покриття для покривних скелець для визначення оптимальних умов росту для первинної культури АГЗН.

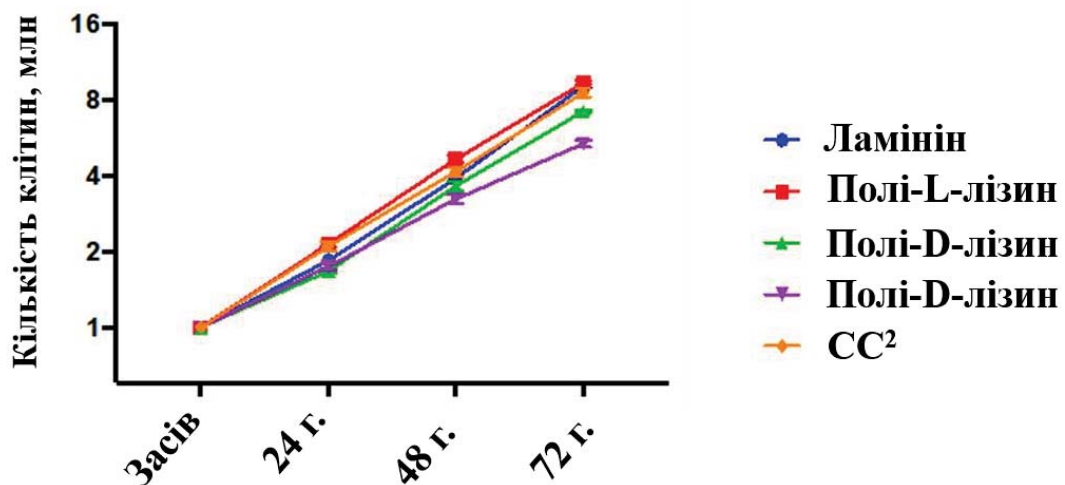
З цією метою ми перевірили для культури АГЗН такі покриття:

- ламінін;
- полі- L-лізин (PLL);
- полі-D-лізин (PDL);
- полі-D-лізин / ламінін (PDLL);
- комерційне покриття CC<sup>2</sup>.

Ламінін є основним глікопротеїдом базальної пластинки позаклітинного матриксу. Його широко використовують для кондиціонування твердих субстратів з метою сприяння росту і проліферації клітин. Показано, що для клітин, які вирощують у безсироватковому середовищі, покриття полі-D-лізином сприяє прикріпленню, розпластуванню, росту та проліферації клітин. Таке покриття також необхідне для вирощування нейритів у культурі нейрональних клітин. Порівняно з полі-L-лізином, застосування полі-D-лізину має перевагу завдяки його меншій доступності для позаклітинних протеаз, однак на практиці використовуються як D-, так і L-ізомери [90]. У наших експериментах ми також перевірили суміш полі-D-лізину та ламініну. Ми також перевірили комерційні покривні скельця, виготовлені за технологією CC<sup>2</sup> (Thermo Scientific). Вони мають хімічно модифіковану поверхню скла, що імітує властивості полілізинових покриттів.

На підставі наших спостережень ми розраховували час подвоєння та побудували криві росту для кожного типу поверхні покривних скелець. Для побудови кривих росту АГЗН, вирощених на різних підкладках, підраховували клітини з використанням трипанового синього (рис. 3.5). Не було виявлено статистично значущих відмінностей, хоча виявилось, що клітини, вирощені на PDLL, показали найменшу проліферацію.

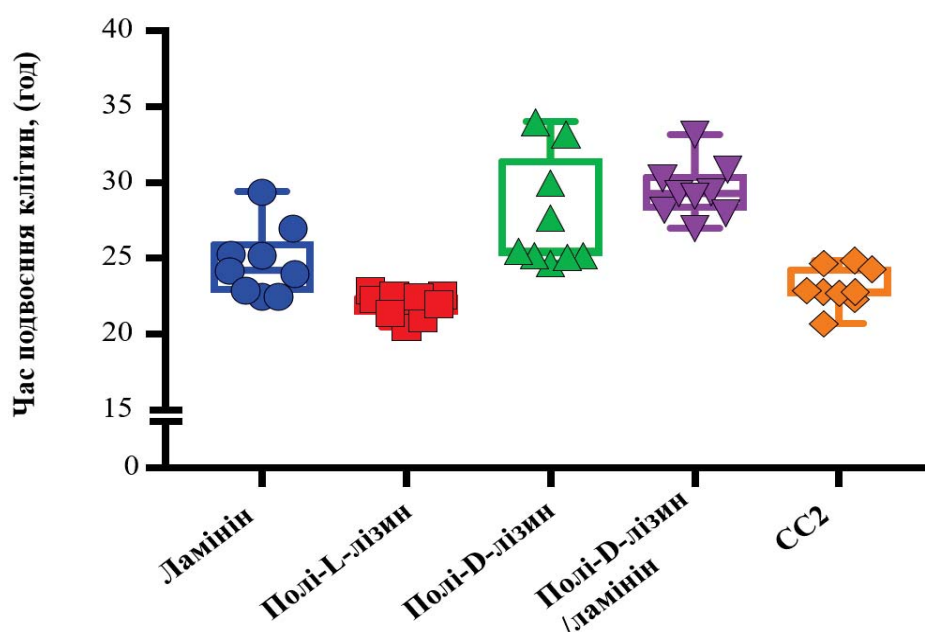
Проведений нами кількісний аналіз не виявив достовірних відмінностей між різними покриттями для тканинної культури (рис. 3.5,  $n = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Зокрема, протягом 72 год спостереження час подвоєння становив від 22 до 29,5 год. Втім, показано, що для покриття полі-L-лізином спостерігалися найшвидший ріст і найнижчий коефіцієнт варіації. Отже, для наступних експериментів, для імуноцитохімії, ми вибрали полі-L-лізин.



**Рис. 3.5** – Криві росту клітин первинної культури АГЗН, вирощеної на різних типах субстратів. Найбільш швидкий ріст спостерігався для поверхні, вкритої полі-L-лізином,  $n = 9$ ,  $p < 0,001$

Для візуалізації характерних особливостей первинної культури АГЗН, вирощеної на покривних скельцях з різним покриттям поверхні, ми застосували імуноцитохімічне забарвлення (рис. 3.6,  $n = 9$ ,  $p < 0,001$ ). Клітини засіювали зі щільністю 2500 клітин на лунку на 96-лункових планшетах із покриттям ламініном, полі-L-лізином, полі-D-лізином чи полі-D-лізин / ламініном або із запатентованим СС<sup>2</sup> покриттям. Після 48 год культивування клітини фіксували протягом 15 хв 4 % параформальдегідом в 0,1 М PBS та обробляли флуоресцентними барвниками згідно з рекомендаціями виробника: AlexaFluor<sup>®</sup> 488 phalloidin у розведенні 1:50,

щоб виявити актинові філаменти, та DAPI (4',6-діамідино-2-феніліндол, дихлоргідрат) – для маркування ядер клітин. Візуалізацію планшетів виконували за допомогою планшетного рідера Cytation3 (Biotek, Winooski, VT) з об'єктивом 63× та світлофільтрами для зеленого флуоресцентного білка (GFP) та DAPI. Зображення отримували, використовуючи функцію мозаїчного сканування лунок програмного забезпечення Gen5 (Biotek, Winooski, VT).



**Рис. 3.6** – Час подвоєння для культури первинних АГЗН при культивуванні на різних типах покриттів

Час подвоєння розраховували за формулою:

$$q = \frac{\Delta\tau \times \log 2}{\log X_2 - \log X_1}$$

де  $q$  - час подвоєння,

$\Delta\tau$  – тривалість культивування,

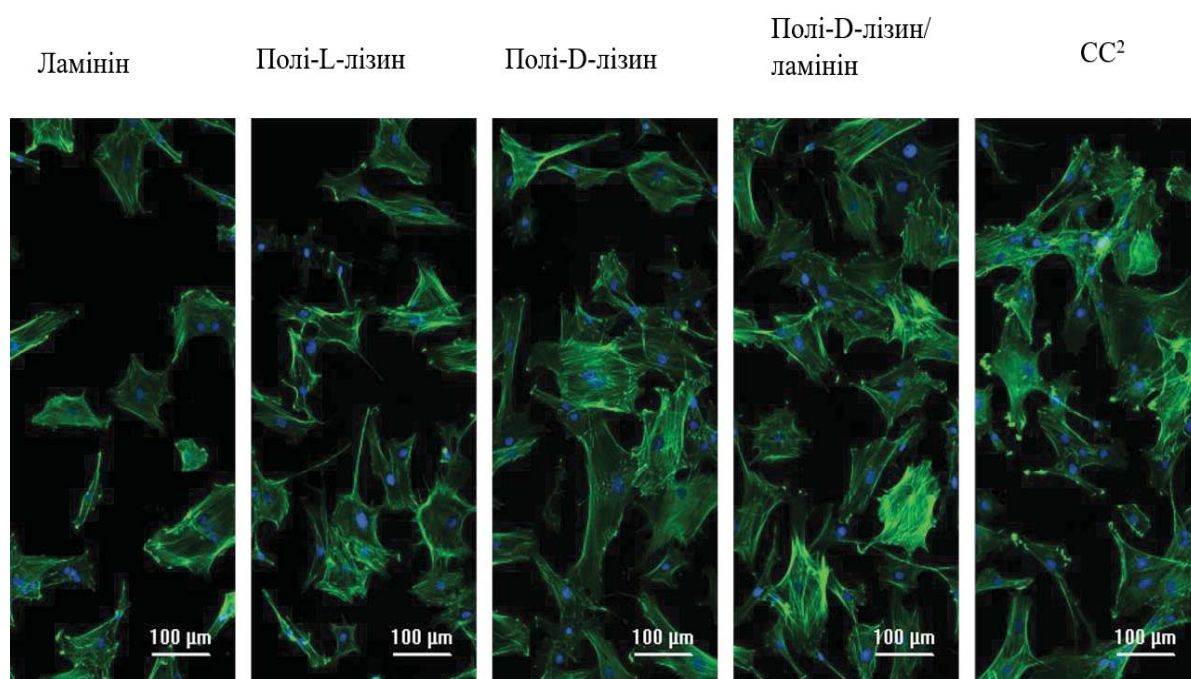
$X_1$  – початкова концентрація біомаси,

$X_2$  – кінцева концентрація біомаси.



Для клітин, вирощених на PLL та  $CC^2$ , показано найшвидше подвоєння, при цьому для PLL виявлено найнижчу варіабельність ( $n = 9, p < 0,001$ ).

Хоча ми не спостерігали жодних суттєвих відмінностей у морфології клітин, вирощених на різних поверхнях для росту, всі клітини, як показало забарвлення за допомогою AlexaFluor<sup>TM</sup> 488 phalloidin, демонстрували ознаки ремоделінгу клітинного актину, крім клітин, які були культивовані на поверхні з покриттям полі-L-лізином (рис. 3.7). Таким чином, було показано, що покривні скельця, вкриті полі-L-лізином, є найкращим субстратом для майбутньої розробки платформи для клітинних аналізів на основі первинної культури АГЗН.



**Рис. 3.7** – Репрезентативні зображення клітин первинної культури АГЗН, вирощених на різних субстратах росту. Забарвлення AlexaFluor<sup>TM</sup> 488 phalloidin. Шкала масштабу: 100 мкм

### 3.3 Валідація первинної культури АГЗН за астроцитарними маркерами

Для валідації отриманої нами культури астроцитів ми провели імуноцитохімічний аналіз за допомогою астроцитарних маркерів. Астроцити голівки зорового нерва засіювали у 24-лункові планшети на круглі скляні покривні скельця діаметром 12 мм, вкриті полі-L-лізином з густиною 7500 на лунку. Через два дні клітини відмивали PBS та фіксували в 4 % параформальдегіді в PBS протягом 15 хв. Після триразового відмивання в PBS та інкубації у блокувальному розчині клітини інкубували протягом ночі при 4 °C з верифікованими первинними антитілами (табл. 3.7). Потім покривні скельця триразово відмивали в PBS та інкубували із вторинними антитілами, кон'югованими з AlexaFluor®, у розчиннику антитіла без  $\text{NaN}_3$  протягом 1 год за кімнатної температури в темряві. Для маркування ядер клітини мітили другою флуоресцентною міткою – DAPI.

У нашому дослідженні було виконано тестування експресії маркера S100 $\beta$ , який є гліальним специфічним кальцій-зв'язуючим білком, що експресується зрілими астроцитами [91]. Ми використовували мишаче моноклональне антитіло проти S100 $\beta$  як первинне антитіло та козяче антимишаче антитіло, мічене Alexa Fluor® 488, як вторинне. Експресію S100 $\beta$  оцінювали за флуоресцентним сигналом зеленого Alexa Fluor® 488 у пробі (рис. 3.7). Клітини нашої первинної культури АГЗН щурів продемонстрували сильну імунореактивність до кальцій-зв'язуючого пептиду S100 $\beta$ .

За аналогічним протоколом ми провели оцінку експресії глутамат-аспартатного транспортера, підтип 1 (GLAST; a.k.a. *excitatory amino acid transporter 1*; EAAT1), який є посередником поглинання L-глутамату, L-аспартату та D-аспартату, спряженого з котранспортом трьох катіонів  $\text{Na}^+$  й одного катіона  $\text{H}^+$  та антипортом одного катіона  $\text{K}^+$ .



Таблиця 3.7

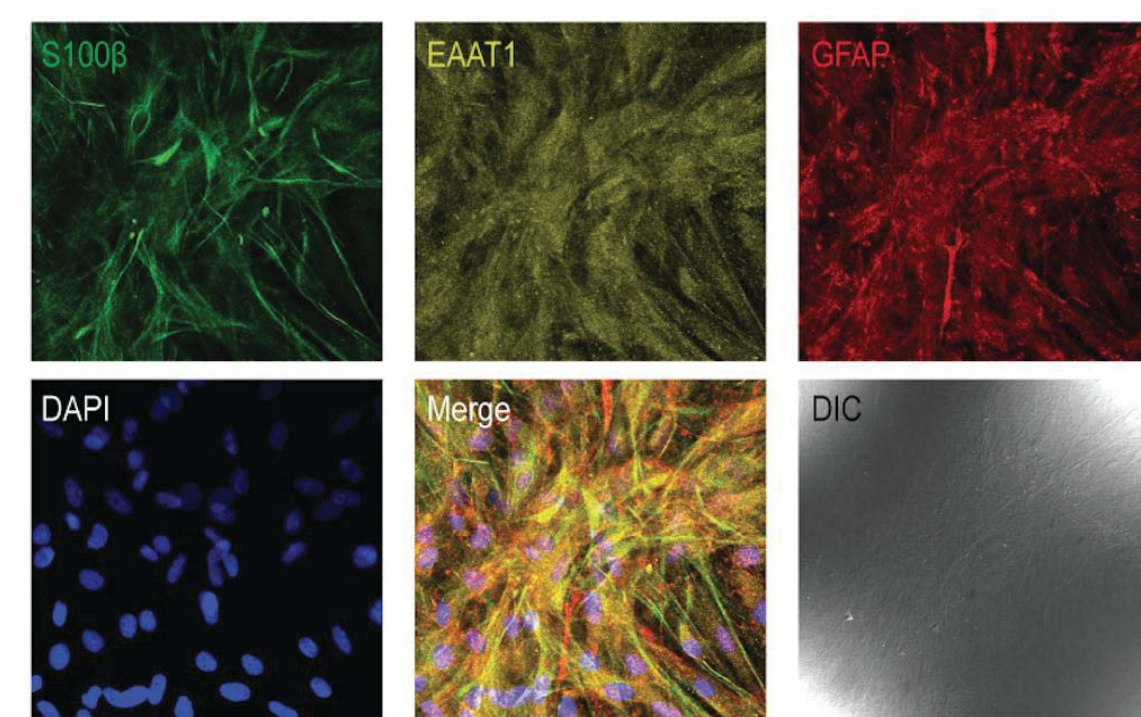
## Антитіла, які було використано для імуноцитохімічного аналізу

Каталожний номер	Виробник	Мішень	Марка	Розведення
ab416	AbCam, Cambridge, MA	Кроляче поліклональне до EAAT1	GR182524	1:200
ab4674	AbCam, Cambridge, MA	Куряче поліклональне до GFAP	GR1473	1:1000
ab11178	AbCam, Cambridge, MA	Мишаче моноклональне до S100 $\beta$ , клон SH-B1	GR173178	1:1000
A-21429	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 555 козяче антикроляче	1107470	1:2000
A-21449	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 козяче антикуряче	1081817	1:2000
A-10667	Life Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 козяче антимишаче	1304746	1:2000
D1306	Life Technologies, Carlsbad, CA	4',6-діамідино-2-феніліндол, дигідрохлорид (DAPI)	1633083	1:50000
A12379	Technologies, Carlsbad, CA	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 фалоїдин	1558760	1:50

Табл. 3.7 містить перелік усіх антитіл та флуоресцентних барвників, використаних для імуноцитохімічної валідації отриманої первинної культури АГЗН за допомогою специфічних астроцитарних маркерів.

Експресія EAAT1 широко виражена у всій центральній нервовій системі, переважно він експресується астроцитами [92]. Для оцінки експресії EAAT1 ми використовували кроляче поліклональне антитіло

проти EAAT1 як первинне та козяче антикроляче антитіло, мічене Alexa Fluor® 555 як вторинне. Експресію EAAT1 оцінювали за флуоресцентним сигналом жовтого Alexa Fluor® 555 у пробі (рис. 3.8). Як і у випадку з S100 $\beta$ , клітини АГЗН були позитивними за експресією EAAT1.



**Рис. 3.8** – Репрезентативні зображення клітин первинної культури АГЗН щурів при імуноцитохімічному забарвленні для типових астроцитарних маркерів: EAAT1, S100 $\beta$  та GFAP. Ядра було марковано з використанням DAPI. Позитивне імунозабарвлення підтверджує астроцитарну ідентичність для отриманої культури АГЗН. Шкала масштабу: 100 мкм

Нарешті, ми перевірили експресію гліального фібрилярного білка (GFAP) у культурі АГЗН. Експресію GFAP вважають прототипним маркером для імуноцитохімічної ідентифікації астроцитів [93]. GFAP є інтермедіатом білка філамента III, який виявлений виключно в астроцитах центральної нервової системи, немієлінізованих шваннівських клітинах периферичної нервової системи та кишкових гліальних клітинах [94]. Ми використовували той самий імуноцитохімічний підхід для того, щоб

охарактеризувати експресію GFAP у нашій культурі АГЗН. Куряче поліклональне антитіло проти GFAP було використано як первинне антитіло, а козяче антикроляче, мічене Alexa Fluor® 647 – як вторинне. Експресію GFAP виявляли на основі червоного флуоресцентного сигналу Alexa Fluor® 647. За даними флуоресцентного сигналу АГЗН експресують GFAP (рис. 3.8), що ідентифікує їх як астроцити.

Таким чином, усі три астроцитарні маркери – S100 $\beta$ , EAAT1 та GFAP – було виявлено в АГЗН, що свідчить про астроцитарний клітинний тип. У додаткових експериментах, не показаних тут, ми перевірили імунореактивність щодо основного білка мієліну (маркера олігодендроцитів) та віментину (маркер фібробластів та активованих астроцитів). Наша культура була негативною відносно обох цих маркерів, що підтверджує її астроцитарну ідентичність.

### Висновки до розділу 3

У цьому розділі описано протокол отримання первинної культури АГЗНГ щурів. Раніше опубліковані методи описують культури АГЗНГ, отримані від новонароджених або молодих дорослих щурів [55–57]. Культури клітин, виділених із молодих тварин, часто містять значну кількість клітин інших типів, таких як олігодендроцити та перицити, які забруднюють культуру [55, 57, 95], що може негативно вплинути на експериментальні робочі потоки та потенціал для скринінгу. На відміну від цього, використовуючи нашу методологію, було отримано первинну культуру АГЗН із клітинами єдиної морфології.

Цього результату було досягнуто завдяки поєднанню ряду важливих факторів. Одним із таких факторів є склад живильного середовища, який повинен сприяти росту АГЗН та обмежувати ріст клітин неастроцитарного типу. Ми встановили, що середовище DMEM із вмістом глюкози 4500 мг/л та без пірувату натрію, доповнене 20 % FBS, забезпечує найкращі умови для росту й проліферації АГЗН. Унікальний склад середовища найкраще підтримував АГЗН, але не підтримував ріст інших, забруднювальних, типів клітин. Слід також зазначити, що тканини для нашої культури АГЗН було одержано у дорослих тварин, що робить її придатною для вивчення гліопротекторних сполук для лікування глаукоми як патології, що пов'язана з віком. Однією з додаткових переваг отриманої нами первинної культури АГЗН є здатність до проліферації та придатність до кріоконсервації. Ми провели перевірку до 15 пасажів та декількох циклів заморожування без виявлення зміни морфологічних та / або функціональних властивостей клітин.

Ще одним корисним висновком було визначення оптимальної підкладки для росту АГЗН на поверхні покривних скелець. За результатами експериментів, які вимагали прикріплення клітин до поверхні, ми встановили, що за часом подвоєння – 22 год, та найнижчою варіабельністю

результатів найкращим покриттям для росту АГЗН слід вважати полі-L-лізин. Це може бути особливо важливим у розробці платформ для скринінгу гліопротекторних сполук, для яких часто необхідно прикріплення клітин до поверхні.

Таким чином, ми змогли отримати первинну культуру АГЗН щурів з морфологічними та функціональними властивостями, придатними для їх використання при скринінгу гліопротекторних сполук для лікування глаукоми.

**Результати, отримані у цьому розділі, опубліковано у таких працях:**

1. Kaja S. Plate reader-based cell viability assays for glioprotection using primary rat optic nerve head astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. Levy, D. H. Zaidi, A. M. Altman, S. Nawazish, J. K. Ghuman, B. C. Gerdes, M. A. Moore, P. Koulen // *Experimental Eye Research*. – 2015. – Vol. 138. – P. 159–166.

2. Kaja S. Differential subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, K. R. Patel, **Y. Naumchuk**, P. Koulen // *Exp Neurol*. – 2015. – Vol. 265. – P. 59–68.

## **РОЗДІЛ 4**

### **РОЗРОБКА ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНОЇ МЕТОДИКИ ТЕСТУВАННЯ ГЛІОПРОТЕКТОРІВ АСТРОЦИТІВ ГОЛІВКИ ЗОРОВОГО НЕРВА**

У попередньому розділі описано виділення первинної культури АГЗН, яка може бути використана для скринінгу гліопротекторів для лікування глаукоми. Наступним етапом нашої роботи стало проведення оптимізації тестів для визначення життєздатності клітин одержаної культури АГЗН. На сьогодні існує велика кількість методів оцінки життєздатності клітин, які можуть бути використані при вивченні гліопротекції або цитопротекції в цілому. Вони включають наведені у нашій роботі методи аналізу, які ґрунтуються на оцінці активності внутрішньоклітинних ферментів, а також методи з використанням вітальних барвників, таких як трипановий синій або нейтральний червоний [95–99]. Застосування вітальних барвників дає змогу візуалізації, тоді як ферментативні аналізи забезпечують більшу точність аналізу, меншу варіабельність та легкість автоматизації [97]. Крім того, різні методи аналізу демонструють селективну чутливість як до різних пошкоджувальних факторів, так і до цитопротекторів, залежно від специфічних механізмів їхньої дії [95, 96, 98, 99]. Наприклад, лактатдегідрогеназний метод може призвести до хибних результатів, якщо чинник впливає тільки на внутрішньоклітинні процеси, без пошкодження цілісності мембрани [99]. Саме тому придатність тесту слід визначати індивідуально для кожного пошкоджуючого фактора та цитопротектора.

#### **4.1 Розробка платформи для скринінгу гліопротекторів на основі аналізу вивільнення ЛДГ**

Розробка фармацевтичних препаратів значною мірою спирається на дослідження життєздатності клітин для оцінки можливої токсичності

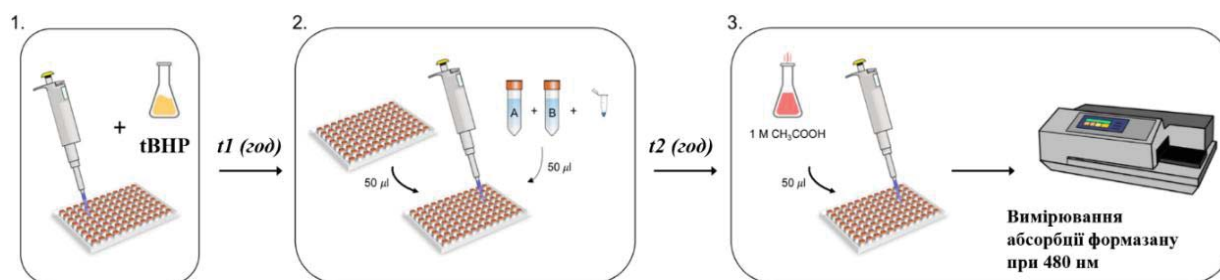
потенційних лікувальних препаратів. L-лактатдегідрогеназа (ЛДГ) – це цитоплазматичний фермент, який каталізує спряжені реакції взаємоперетворення пірувату до L-лактату та NADH до  $\text{NAD}^+$  при гліколізі, та зворотні реакції в циклі Корі. У відповідь на пошкодження клітин, індуковане ендогенними клітинними механізмами або викликане дією екзогенних пошкоджуючих чинників, ЛДГ вивільняється з цитоплазми у позаклітинне середовище. Стабільність ЛДГ у культуральному середовищі робить її цілком прийнятним корелятом для виявлення пошкодження чи токсичності у тканинах і клітинах. Кількісна оцінка активності ЛДГ є широко застосовним методом оцінки життєздатності клітин, який забезпечує швидко, надійну та відтворювану інформацію про потенційну токсичність експериментальних сполук та потенційних лікувальних препаратів [71–73]. Експериментально активність ЛДГ, як правило, визначається за допомогою сполученої ферментативної реакції, де ЛДГ окислює лактат до пірувату, який згодом реагує з йодонітетразолій хлоридом (INT) з утворенням формазану. Формазан розчинний у воді та може бути легко виявлений фотометричним методом при вимірюванні абсорбції при 490 нм (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Основним припущенням для цього аналізу є те, що будь-яке збільшення утворення формазану в культуральному супернатанті прямо корелює з життєздатністю клітин.

Незважаючи на наявність комерційних тест-систем для визначення ЛДГ, ми вважали їхнє використання в нашій роботі недоцільним, оскільки вміст запатентованих реагентів у їхньому складі практично виключає будь-яку можливість оптимізації, а також через їх високу вартість (близько 30–100 доларів за 96-лунковий планшет). Тому ми «реконструювали» спеціальний аналіз ЛДГ, який базується на тих самих хімічних процесах та використовує схожий протокол.

Ми оптимізували спеціальний метод аналізу вивільнення ЛДГ (ЛДГ<sub>r</sub>) для культури АГЗН з раніше розробленого та валідованого протоколу для дослідження гліопротекції з використанням клітин астрогліоми C6 [89].



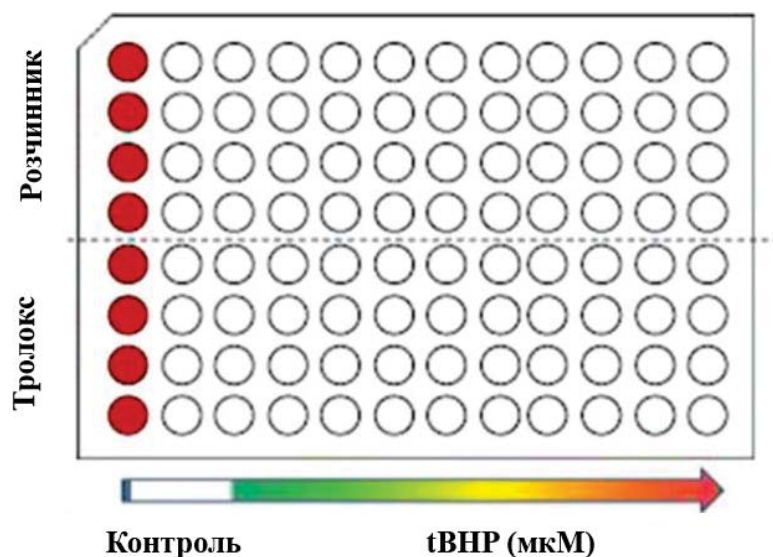
Схему робочого протоколу аналізу вивільнення ЛДГ для АГЗН показано на рис. 4.1.



**Рис. 4.1** – Робочий процес аналізу вивільнення ЛДГ. Аналіз виконують згідно з лінійним тристадійним протоколом: 1 – додання тестових сполук (наприклад, tBHP); 2 – ЛДГ-аналіз – перенесення 50 мкл зразка з планшета зразків на планшет для аналізу та додавання 50 мкл буферного розчину; 3 – додавання 50 мкл стоп-реагенту після 1-годинної інкубації в темряві та вимірювання абсорбції при  $\lambda = 490$  нм ( $OD_{490}$ )

Експозицію клітин із tBHP проводили у 96-лункових планшетах, у які було попередньо засіяно виділені АГЗН із густиною 7500 клітин на лунку. Схему обробки зображено на рис. 4.2.

Після експозиції заданої тривалості з tBHP у 50 мкл культурального супернатанту переносили у нестерильні прозорі 96-лункові планшети (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Потім додавали 50 мкл тест-буфера (2 мМ INT, 3,2 мМ натрієва сіль нікотинамід аденін динуклеотиду, 160 мМ лактат літію, 7,5 мМ MPMS у 0,2 М Трис-HCl, pH 8,2). Тест-буфер готували змішуванням 2,5 мл буфера А, 2,5 мл буфера Б та 0,5 мл MPMS – стокових розчинів, які готували заздалегідь: буфер А (2×; 4 мМ INT в 0,2 М Трис-HCl, pH 8,2), буфер Б (2×; 6,4 мМ натрієвої солі β-нікотинамід-аденін-нуклеотиду, 320 мМ лактату натрію в 0,2 М Трис-HCl, pH 8,2) та 20000× MPMS у 0,2 М Трис-HCl, pH 8,2; аліквоти розчинів зберігали за  $-20^{\circ}\text{C}$  без втрати активності. Тест-буфер готували безпосередньо перед додаванням до зразків супернатанту. Після додавання тест-буфера зразки перемішували на орбітальному шейкері (від 300 до 500 обертів на хвилину протягом 15 с).



**Рис. 4.2** – Схема розміщення зразків на планшеті. Кожна умова перевіряється в чотирьох технічних повторях. Перший стовпчик містить контрольні лунки для ЛДГ-аналізу. Верхня частина планшета зарезервована для попередньої обробки розчинником, тоді як у лунки нижньої частини додається тестова сполука. У лунки стовпчиків 3–12 вноситься індуктор оксидативного стресу tBHP у зростаючих концентраціях

Планшети інкубували за кімнатної температури у темряві протягом відповідного періоду часу. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл 1 М оцтової кислоти. Потім зразки знову перемішували на орбітальному шейкері (від 300 до 500 обертів на хвилину протягом 15 с).

Вивільнення ЛДГ кількісно оцінювали шляхом вимірювання абсорбції при 490 нм ( $OD_{490}$ ) за допомогою планшетного рідера Synergy H1 (Biotek, Winooski, VT). Дані експортували в Microsoft Excel (Microsoft Corp.) для обробки, де вони були нормалізовані відносно контролю (0 мкМ tBHP). Аналіз даних було виконано аналогічно до описаного вище для МТТ-тесту (див. розд. 2). Значення показника для одиночних лунок зі значними відхиленнями виключались із масиву даних для певної концентрації tBHP. У середньому на один 96-лунковий планшет було виключено 2 точки; максимальна кількість виключених точок на планшет становила 5 лунок.

Припускаючи гауссовий розподіл даних, ми виключали будь-які точки за межами двох стандартних відхилень від середнього по стовпчику. Нормалізовані дані було згруповано відповідно до умов попередньої обробки (контроль, розчинник і Тролокс) та експортовано у програмне забезпечення Prism (GraphPad) для статистичного аналізу і побудови графіків. Для визначення середніх значень tВНР для кожного варіанта попередньої обробки було проведено нелінійний регресійний аналіз з використанням 4-параметричного логістичного рівняння з різним нахилом Хілла окремо для кожного біологічного повтору (96-лунковий планшет). Дані було проаналізовано з використанням двостороннього дисперсійного аналізу (ANOVA) з постхок поправкою Бонфероні, з урахуванням умов попередньої обробки (контроль, розчинник або Тролокс) та концентрації tВНР як змінних. Статистичну значущість було визначено як  $p < 0,05$ .

Для того, щоб кількісно оцінити максимальну активність ЛДГ, нами було модифіковано протокол визначення загальної ЛДГ (ЛДГt). Лізис клітин виконували за допомогою неіонного детергенту тритону X-100. Розчин для лізису готували змішуванням 4,5 мл тритону X-100 з 45,5 мл води з наступним перемішуванням на вортексі та фільтрацією для видалення нерозчинних залишків, до кінцевої концентрації 9 % (в/в) тритону X-100 у воді.

До кожної контрольної лунки зразка для аналізу ЛДГ додавали відповідну кількість 10× розчину для лізису, а саме, до кожних 100 мкл супернатанту в кожній лунці додавали 10 мкл 10× розчину для лізису. Зразки додатково перемішували протягом 3 хв на орбітальному шейкері для повного лізису клітин. Аліквоту 50 мкл із кожної проби лунки переносили в новий прозорий 96-лунковий планшет. Далі зразки обробляли, як описано в протоколі для визначення ЛДГ вивільненої.

Якщо обидві методики кількісного визначення вивільненої та загальної ЛДГ ставили на одному планшеті, до тест-реагенту для визначення ЛДГ вивільненої додавали розчин для лізису до 5–10 % за об'ємом з метою

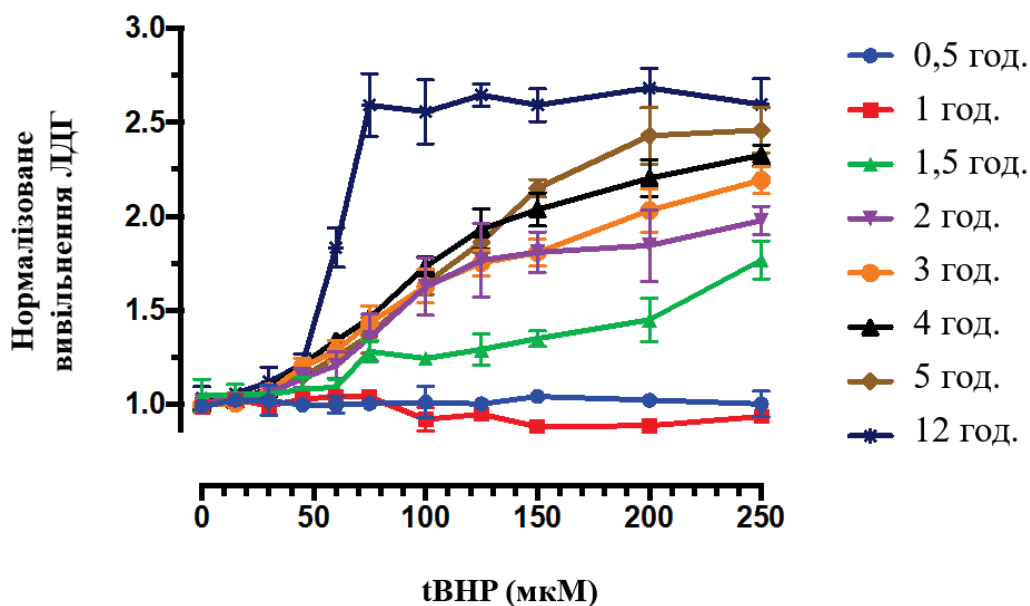
контролю додавання тритону X-100 на стадії лізису та його впливу на кінетику ферментативної реакції ЛДГ. У цьому випадку цитотоксичність може бути розрахована за формулою:

$$\% \text{ цитотоксичності} = \frac{OD_{490}(\text{LDHr})}{OD_{490}(\text{LDHt})} \times 100$$

Далі нами було оптимізовано цей протокол для первинної культури АГЗН, яку описано у попередньому розділі. Враховуючи роль оксидативного стресу в ряді патологій, а також у фізіології старіння, ми використовували tBHP як засіб хімічної індукції оксидативного стресу. Для того, щоб продемонструвати здійсненність процедури тестування нейропротекторних сполук, ми обрали прототипний антиоксидант Тролокс.

Астроцити голівки зорового нерва були ізольовані, як описано раніше, та засіяні у 96-лунковий планшет у живильному середовищі з густиною 7500 клітин на лунку, до загального об'єму 100 мкл у кожній лунці. Після додавання обраного гліопротекторного засобу (Тролокс, 100 мкМ) проводили інкубацію протягом 1 год у стандартних умовах культивування культури тканини. Додавали tBHP зі збільшенням концентрації (10 мкМ – 1 мМ) з наступною інкубацією протягом 1 год у стандартних умовах культивування. Нарешті, проводили визначення ЛДГ вивільненої та загальної за протоколом.

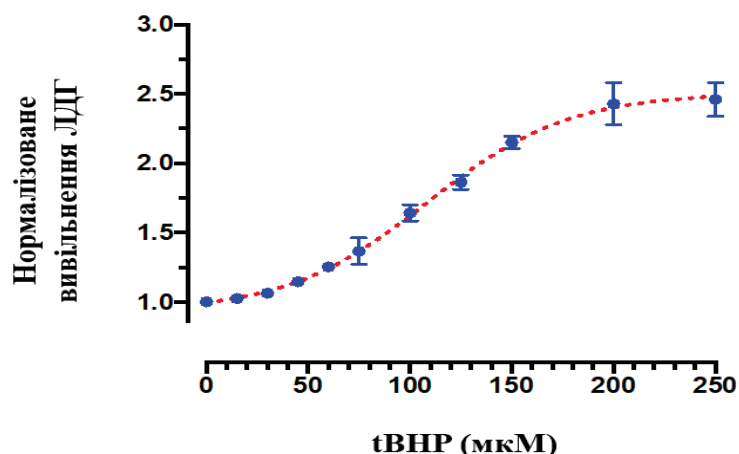
Наступним важливим етапом оптимізації став підбір оптимальної тривалості дії стимуляторів оксидативного стресу. Необхідність підбору тривалості інкубації з прооксидантами обумовлена здатністю клітин до поглинання та реутилізації виділеної ЛДГ. У разі надто короткої інкубації кількість вивільненої ЛДГ могла б виявитись замалою для її кількісного визначення, тоді як занадто довга інкубація могла нівелювати залежність від концентрації прооксиданта. Ми провели оптимізацію тривалості впливу індуктора оксидативного стресу при інкубації від 30 хв до 12 год при зростаючій концентрації tBHP (від 1 до 250 мкМ) (рис. 4.3,  $n = 24$ ,  $p < 0,05$ ).



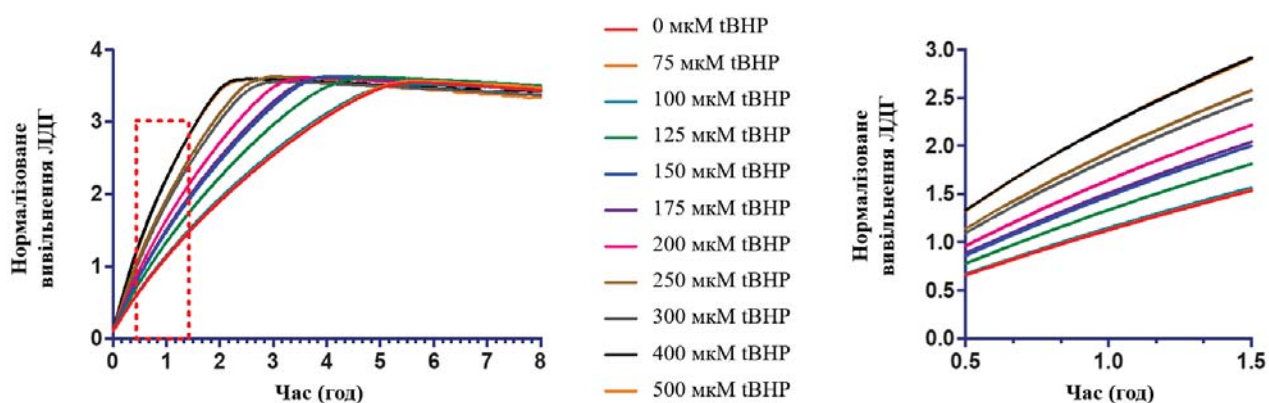
**Рис. 4.3** – Оптимізація тривалості дії індуктора оксидативного стресу (від 30 хв до 12 год) при зростаючій концентрації tBHP на основі фотометричного визначення ЛДГ (вимірювання абсорбції при  $\lambda = 490$  нм),  $n = 24$ ,  $p < 0,05$

Було показано, що за коротких інкубацій не спостерігається збільшення виділення ЛДГ, тоді як інкубація протягом ночі викликає різке його збільшення, проте з обмеженим динамічним діапазоном. Ґрунтуючись на цих спостереженнях, ми визначили, що подальші дослідження доцільно проводити за умов 5-годинної інкубації (рис. 4.4,  $n = 24$ ,  $p < 0,05$ ).

Наступним завданням стала оптимізація часу інкубації з тест-буфером для визначення ЛДГ. Це необхідно для отримання динамічного вікна, що дозволяє диференціювати сигнал та максимізувати співвідношення сигнал / шум. У разі високих концентрацій tBHP сигнал виходить на плато приблизно через 2 год від початку інкубації, тоді як для більш низьких концентрацій tBHP досягнення плато спостерігається через 5 год (рис. 4.5,  $n = 24$ ,  $p < 0,05$ ). За результатами дослідження ми обрали для подальшої роботи 1-годинну інкубацію з тест-буфером. За цієї умови значення поглинання не досягає максимуму, що дозволяє адекватно оцінити сигнал.



**Рис. 4.4** – Оптимізація тривалості дії індуктора оксидативного стресу при зростаючій концентрації tBHP на основі фотометричного визначення ЛДГ (вимірювання абсорбції при  $\lambda = 490$  нм),  $n = 24$ ,  $p < 0,05$



**Рис. 4.5** – Оптимізація тривалості інкубації з тест-буфером на основі фотометричного визначення ЛДГ (вимірювання абсорбції при  $\lambda = 490$  нм).

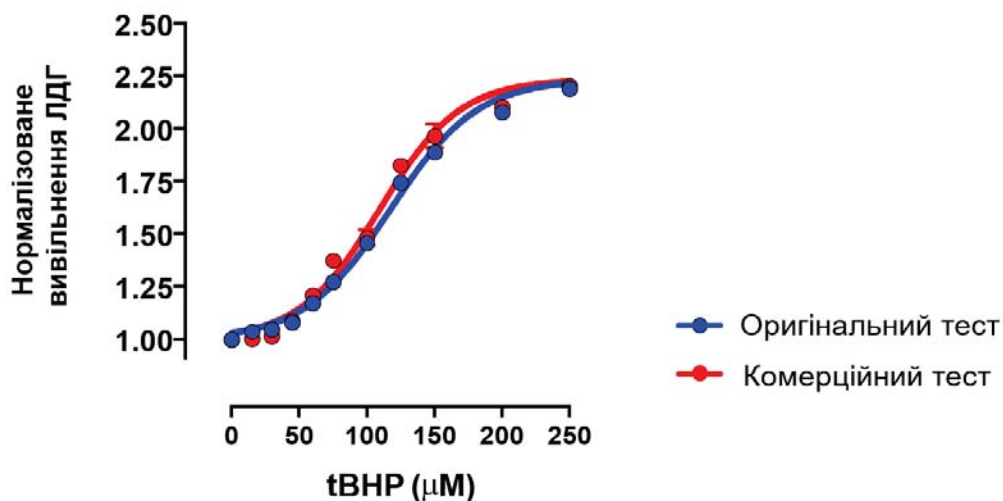
Інкубація протягом години забезпечує необхідне динамічне вікно, щоб диференціювати сигнал та максимізувати співвідношення сигнал / шум для всіх використаних концентрацій tBHP (0 – 500 мкМ),  $n = 24$ ,  $p < 0,05$

Слід зазначити, що, крім специфічних властивостей клітин, на рівень вивільнення ЛДГ можуть впливати деякі інші чинники. Так, наприклад, сироватки, такі як FBS, що використовується в середовищі для росту клітин, часто містять ЛДГ та можуть впливати на підвищення базового рівня активності ЛДГ. Крім того, досі не встановлено однозначно, як на



активність ЛДГ у сироватці впливає її теплова інактивація. Тому ми вважаємо доцільним перевіряти ендogenous активність сироватки шляхом постановки кількох безклітинних контролів: на сироватку та / або повне середовище. Як правило, рівень ЛДГ у повному середовищі близький до рівня ЛДГ необроблених клітин.

На останньому етапі ми порівняли нашу методику із комерційним продуктом. Як показано на рис. 4.6 ( $n = 24, p < 0,05$ ), результати визначення ЛДГ за нашою методикою були ідентичні результатам, отриманим з комерційною тест-системою, з деяким зменшенням розкиду даних.



**Рис. 4.6** – Порівняння комерційної тест-системи для аналізу вивільнення ЛДГ з методикою аналізу вивільнення ЛДГ, розробленою в нашому проекті.

Хоча наш аналіз вивільнення ЛДГ у 50 разів дешевший, ми забезпечуємо таку ж точність випробувань, як комерційний продукт,  $n = 24, p < 0,05$

Якщо брати економічну складову, то вартість комерційного аналізу становить 300–500 \$ за 10 планшетів, тобто 30–50 \$ за 1 планшет, тоді як наш аналіз коштує 1,2 \$ за планшет, що в 30–50 разів дешевше порівняно з комерційною ціною. Ще однією важливою перевагою нашого аналізу є відомий склад компонентів, що дає можливість регулювати аналітичні буферні реагенти для бажаних клітинних типів та умов скринінгу.



## 4.2 Продукція РФК у первинній культурі АГЗН протягом оксидативного стресу, індукованого tBHP

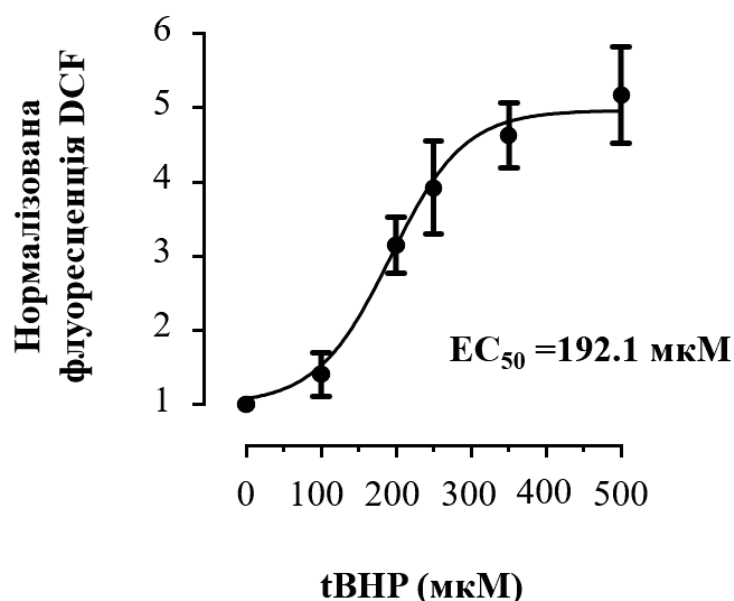
У наших попередніх експериментах, виконаних з використанням розробленої нами методики аналізу ЛДГ, було успішно показано, що обробка tBHP спричиняє зниження життєздатності клітин. Однак необхідно було надати докази того, що обробка tBHP справді викликає збільшення кількості РФК у нашій експериментальній системі. Для цього було поставлено метод із застосуванням DCFDA, також відомого як H2DCFDA – флуоресцентного індикатора РФК, який здатний проникати через мембрани. Після дифузії до клітини DCFDA / H2DCFDA деацетилюється внутрішньоклітинними естеразами до нефлуоресцентної сполуки, яка пізніше окислюється РФК до DCF. DCF є флуоресцентною сполукою, яка може бути виявлена за допомогою флуоресцентної спектроскопії з максимумом збудження та емісії 495 та 529 нм відповідно. Астроцити голівки зорового нерва були виділені, як описано раніше, та засіяні в 96-лункових планшетах у повному середовищі до якого додавали по 10 мкл DCFDA. Після 45-хвилинної інкубації застосовували tBHP у відповідних концентраціях як хімічний індуктор оксидативного стресу. Після відмивки вимірювали флуоресценцію при довжинах хвиль збудження  $\lambda = 490$  нм та емісії  $\lambda = 525$  нм.

Наші результати показали, що DCFDA-аналіз дозволяє виявити навіть незначне збільшення рівня РФК. Встановлено, що збільшення концентрації tBHP викликає дозозалежне підвищення внутрішньоклітинного рівня РФК (рис. 4.7).

Виявлено, що рівень РФК збільшувався порівняно з контролем у  $4,97 \pm 0,33$  рази максимально (рис. 4.7). Дані було апроксимовано із застосуванням 4-параметричної асиметричної нелінійної регресійної моделі. Статистично значуще збільшення РФК за результатами одностороннього

дисперсійного аналізу ANOVA з постхок поправкою Бонфероні ми отримали при концентраціях tBHP, які перевищували 100 мкМ (рис. 4.7).

Напівмаксимальну ефективну концентрацію tBHP за його впливом на рівень РФК було визначено шляхом апроксимації даних для кожного індивідуального  $n$ , після чого було розраховано середнє значення для групи з урахуванням стандартної помилки середнього ( $M \pm SE$ ) ( $192,1 \pm 15,7$  мкМ tBHP, рис. 4.7).



**Рис. 4.7** – Кількісна оцінка утворення РФК в культурі клітин АГЗН (4-й пасаж) за допомогою DCFDA-тесту. Виявлено підвищення продукції РФК у 4,97 рази (максимум) після обробки tBHP порівняно з контролем (0 мМ tBHP), дані подано як  $M \pm SE$

### 4.3 Стандартизація комерційних тестів для визначення життєздатності клітин для первинної культури АГЗН

Окрім спеціального аналізу для визначення ЛДГ, ми оптимізували комерційні тести для кількісної оцінки життєздатності клітин АГЗН. Тест, оснований на поглинанні кальцеїну-АМ, застосовується для оцінки життєздатності клітин. Він ґрунтується на здатності ендогенних естераз

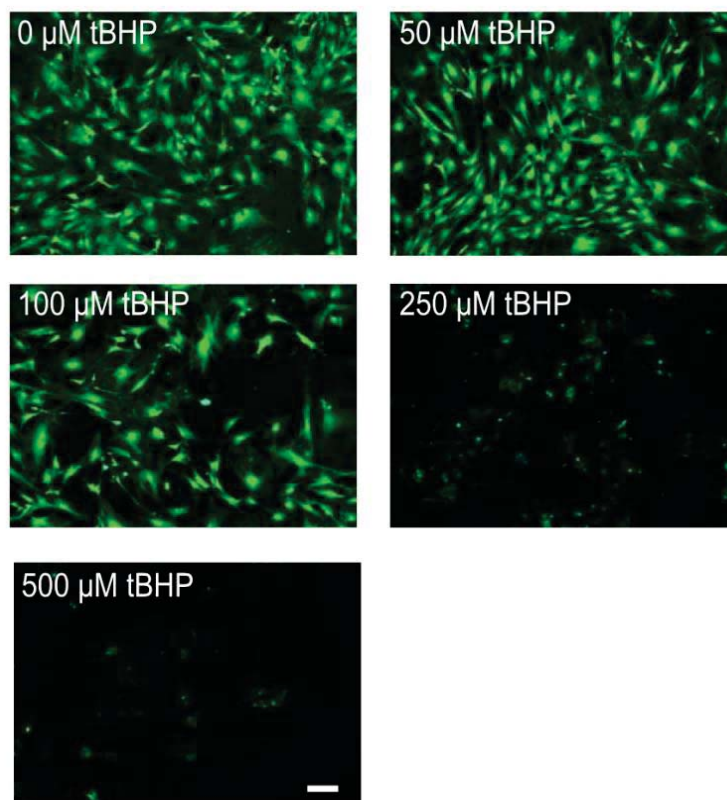
перетворювати нефлуоресцентний мембранопроникний барвник кальцеїн-АМ у сильно флуоресцентний, не здатний до проникнення через мембрани барвник кальцеїн, шляхом відщеплення ацетоксиметильної групи (АМ). Відомо, що, якщо клітина гине, цитоплазматичні естерази втрачають активність одними з перших. Підвищення рівня оксидативного стресу впливає на клітинну життєздатність, а отже, на ферментативну активність клітинних естераз, що призводить до зниження флуоресценції кальцеїну при застосуванні зростаючих концентрацій tBHP. Крім того, апоптичні та мертві клітини з пошкодженими клітинними мембранами не утримують кальцеїн.

Астроцити голівки зорового нерва було виділено, як описано раніше, та засіяно з густиною 7500 клітин на лунку в 96-лункових планшетах у повному середовищі, до якого додавали кальцеїн-АМ до концентрації 5 мкМ з 5 мМ стокового розчину в ДМСО. Клітини інкубували протягом 1 год в стандартних умовах культивування: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, вологість 95 %. Після цього клітини двічі відмивали PBS та вимірювали флуоресценцію при довжинах хвиль збудження  $\lambda = 485$  нм та емісії  $\lambda = 530$  нм.

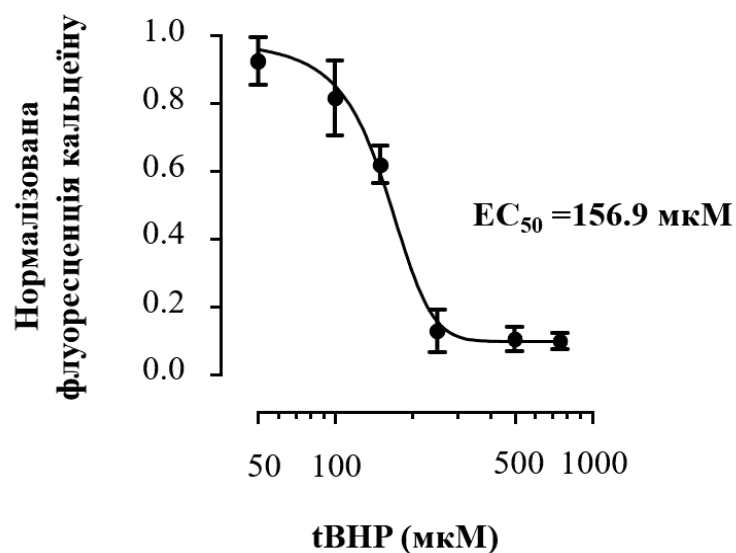
Візуалізація АГЗН за допомогою мікроскопії показала дозозалежне зниження інтенсивності флуоресценції відповідно до збільшення концентрації tBHP. Типові зображення АГЗН подано на рис. 4.8.

Флуоресценцію було виміряно з використанням параметрів, описаних вище для DCFDA-тестування. Значення напівмаксимальної ефективної концентрації (EC<sub>50</sub>), яке було визначено за допомогою апроксимації кожного індивідуального набору даних, становило (156,9 ± 3,8) мкМ tBHP (рис. 4.9).

На наступному етапі ми оптимізували метод на основі відновлення МТТ-тесту, який, як відомо, є хорошим показником проліферації та життєздатності клітин. Безбарвний МТТ поглинається клітиною та перетворюється мітохондріальними редуктазами на фіолетовий формаган. Втрата функції мітохондріальних ферментів відбувається наприкінці процесу загибелі клітин, що робить МТТ-тест хорошим показником.



**Рис. 4.8** – Репрезентативні зображення АГЗН (5-й пасаж), забарвлених кальцеїном. Спостерігається дозозалежне зниження інтенсивності флуоресценції відповідно до збільшення концентрації tBHP. Масштаб: 25 мкм



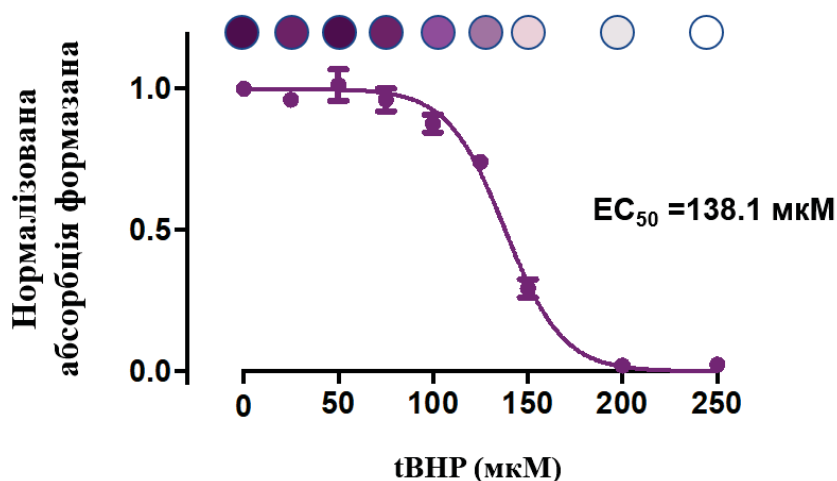
**Рис. 4.9** – Кількісна оцінка флуоресценції кальцеїну в культурі клітин (4-й пасаж). Нормалізовані дані апроксимовані з використанням асиметричної нелінійної регресійної моделі, дані подано як  $M \pm SE$

Оскільки для проведення МТТ-тесту необхідний клітинний матеріал, тоді як для аналізу ЛДГ використовують культуральний супернатант, це дало нам можливість постановки обох методів в одному експерименті для верифікації нашого методу аналізу ЛДГ.

Існує декілька різних протоколів, які використовують різні реагенти для лізису клітин після інкубації з МТТ. Ми випробували ДМСО, ізопропанол, 0,1 М SDS з 10 мМ HCl та Triton X-100 й отримали найкращі результати з ДМСО. Використання ізопропанолу було припинено через значну фіксацію клітин, що призводило до неоднорідного розподілу барвника. При використанні 0,1 М SDS з 10 мМ HCl фіксація клітин була меншою, але навіть невелике підкислення середовища HCl спричиняло реверсію відновленого МТТ до його незабарвленої форми. Існують також повідомлення в літературі щодо проведення лізису з розчинами, які містять до 50 % диметилформаміду [100], однак ми утримались від тестування диметилформаміду через його токсичність. При роботі з новими типами клітин оптимізація методів є беззаперечно необхідною процедурою. У цьому випадку однорідність аналізованого продукту, яка є критичною для отримання відтворюваних та узгоджених між собою даних, може бути досягнена лише за умови повного лізису клітин. Тому необхідно було також оптимізувати параметри струшування планшетів при виконанні лізису. Встановлено, що для повного лізису клітин ДМСО достатнім є струшування планшетів при 180 об/хв протягом 2–3 хв.

Таким чином, для виконання МТТ-тесту АГЗН виділяли, як описано раніше, та засіювали з густиною 7500 клітин на лунку в 96-лункових планшетах. Потім аспірували культуральний супернатант та замінювали його на 1,2 мкМ МТТ у HBSS з кальцієм та магнієм, доповненому 10 мМ 4-(2-гідроксіетил)-1-піперазин-етансульфою (HEPES), рН 7,3, який вносили в об'ємі 100 мкл у кожен лунку. Клітини інкубували протягом 2 год при 37 °С. Супернатант аспірували та проводили процедуру лізису з 100 мкл ДМСО при м'якому струшуванні. Утворення формагану кількісно

оцінювали фотометричним методом, вимірюючи абсорбцію при  $\lambda = 570$  нм. Напівмаксимальна ефективна концентрація ( $EC_{50}$ ), яку було визначено при апроксимації кожного індивідуального набору даних, становила  $(138,1 \pm 1,4)$  мкМ tBHP (рис. 4.10,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$ ).

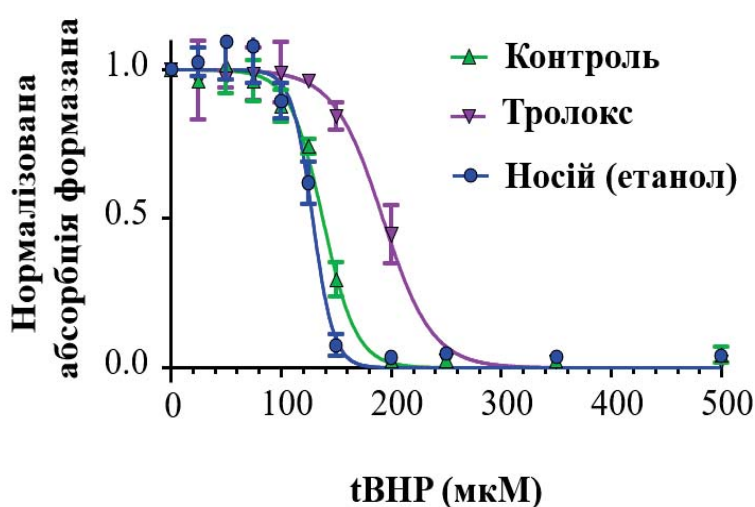


**Рис. 4.10** – Крива доза-ефект для tBHP у МТТ-аналізі в культурі клітин АГЗН (4-й пасаж). Дані апроксимовано із застосуванням 4-параметричної асиметричної нелінійної регресійної моделі. Дані представлені як  $M \pm SE$  з різних планшетів. Напівмаксимальна ефективна концентрація ( $EC_{50}$ ) для tBHP становила  $(138,1 \pm 1,4)$  мкМ tBHP,  $n = 3$ ,  $p < 0,05$

#### **4.4 Валідація розробленої нами скринінгової платформи на основі визначення ЛДГ за допомогою прототипного антиоксиданта Тролоксу**

Наступну серію наших експериментів було спрямовано на валідацію наших протоколів у дослідженнях гліопротекторів з використанням первинної культури АГЗН. Зокрема, ми оцінювали протекторну дію прототипного антиоксиданта Тролокс відносно індуктора оксидативного стресу tBHP, який використовували для моделювання оксидативного стресу при захворюваннях в сітківці та ГЗН.

Оксидативний стрес в культурі АГЗН кількісно оцінювали за допомогою різних методів визначення життєздатності клітин: методом оцінки вивільнення ЛДГ та у МТТ-тесті. Значення  $EC_{50}$  для tBHP, визначене в МТТ-тесті, становило  $(138,1 \pm 1,4)$  мкМ; значення для розчинника (0,1 % етанол) статистично не відрізнялись  $((128,1 \pm 1,6)$  мкМ). Між тим, застосування Тролоксу суттєво зміщувало значення  $EC_{50}$  вправо зі значенням  $(192,7 \pm 2,8)$  мкМ (рис. 4.11,  $n = 24$ ;  $p < 0,05$ ).

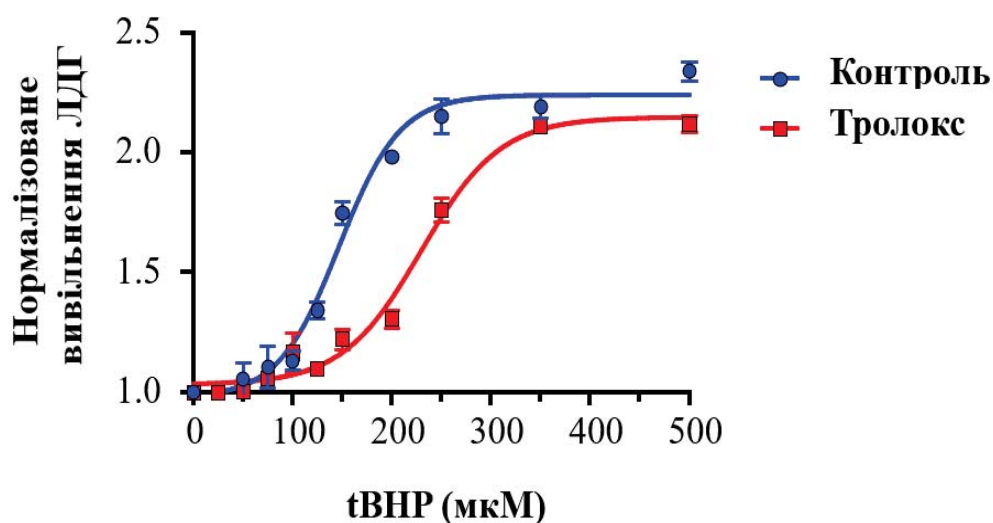


**Рис. 4.11** – Крива доза-ефект для tBHP у МТТ-аналізі в культурі клітин АГЗН (7-й пасаж). Застосування Тролоксу зміщує значення напівмаксимальної ефективної концентрації ( $EC_{50}$ ) вправо з  $(138,1 \pm 1,4)$  до  $(192,7 \pm 2,8)$  мкМ. Значення  $EC_{50}$ , отримані в МТТ-тесті для контролю, розчинника (0,1 % етанол) та Тролоксу (100 мкМ) становили  $(138,1 \pm 1,4)$ ,  $(128,9 \pm 1,6)$  та  $(192,7 \pm 2,8)$  мкМ відповідно,  $n = 24$ ;  $p < 0,05$

При постановці нашої методики кількісної оцінки вивільнення ЛДГ, оптимізованої для первинної культури АГЗН, ми отримали схожі результати. Після обробки tBHP рівень ЛДГ підвищувався у 2,2 рази порівняно з контролем. Значення  $EC_{50}$  становило  $(146,9 \pm 4,9)$  мкМ у контролі та  $(246,3 \pm 7,3)$  мкМ після попередньої обробки Тролоксом



(рис. 4.12,  $n = 24$ ;  $p < 0,05$ ). Розчинник (0,1 %-й етанол) не мав статистично значущого впливу на вивільнення ЛДГ.



**Рис. 4.12** – Крива доза-ефект для tBHP у МТТ-аналізі в культурі клітин АГЗН (7-й пасаж). Застосування Тролоксу зміщує значення напівмаксимальної ефективної концентрації ( $EC_{50}$ ) вправо з  $(138,1 \pm 1,4)$  до  $(192,7 \pm 2,8)$  мкМ. Значення  $EC_{50}$ , отримані в МТТ-тесті, для контролю, розчинника (0,1 % етанол) та Тролоксу (100 мкМ) становили  $(138,1 \pm 1,4)$ ,  $(128,9 \pm 1,6)$  та  $(192,7 \pm 2,8)$  мкМ відповідно,  $n = 24$ ;  $p < 0,05$

## Висновки до розділу 4

У нашій роботі представлено ряд протоколів, які описують планшетні методи дослідження гліопротекторів з використанням первинної культури АГЗН щурів.

Нами було розроблено відтворюваний метод кількісної оцінки вивільнення ЛДГ, оптимізований для культури АГЗН, та валідовано його. На відміну від комерційних тест-систем для визначення ЛДГ, які містять запатентовані реагенти та характеризуються високою вартістю, наші протоколи надають широкі можливості для оптимізації відповідно до завдань експерименту, забезпечують низьку варіабельність та є на порядок дешевшими.

Нами виявлено значний рівень продукції РФК у первинній культурі АГЗН при обробці tBHP у зростаючих концентраціях, що свідчить про чутливість цих клітин до індукторів окисного стресу. Значення напівмаксимальної ефективної концентрації tBHP ( $EC_{50}$ ) за результатами флуоресцентного аналізу за допомогою DCFDA становило  $(192,1 \pm 15,7)$  мкМ.

Показано, що в моделі оксидативного стресу, індукованого tBHP у первинній культурі АГЗН, тести поглинання кальцеїну-АМ, а також МТТ-тест та наш метод кількісної оцінки вивільнення ЛДГ дали схожі результати, показавши значення з низькою варіабельністю показника загибелі клітин у відповідь на оксидативний стрес та за умов цитопротекції Тролоксом. При визначенні життєздатності АГЗН після оксидативного стресу, індукованого tBHP, у дослідженні поглинання кальцеїну-АМ встановлено значення напівмаксимальної ефективної концентрації  $EC_{50} = (156,9 \pm 3,8)$  мкМ. Значення  $EC_{50}$  для tBHP, визначене в МТТ-тесті, становило  $(138,1 \pm 1,4)$  мкМ, а за умови попередньої обробки АГЗН 100 мкМ Тролоксом збільшувалось до  $(192,7 \pm 2,8)$  мкМ. При дослідженні життєздатності клітин методом аналізу вивільнення ЛДГ значення  $EC_{50}$

для tBHP становило  $(146,9 \pm 4,9)$  та  $(246,3 \pm 7,3)$  мкМ для умов контролю та Тролокса відповідно.

Таким чином, показано можливість використання первинної культури АГЗН щурів у тестах із використанням планшетного рідера в дослідженнях, спрямованих на пошук нових лікарських засобів для лікування глаукоми та розладів ЗН і його голівки. Отримані результати можуть бути використані для видозміни цих оригінальних стандартизованих протоколів у високопродуктивні та багатопараметричні платформи.

**Результати, отримані у цьому розділі, опубліковано у таких працях:**

1. **Наумчук Ю. А.** Оптимізація тестів життєздатності клітин для скринінгу гліопротекторних сполук у культурі первинних астроцитів голівки зорового нерва щура / **Ю. А. Наумчук**, В. Б. Максименко, С. Кая // Наук. вісті НТУУ «КПІ». – 2017. – № 6. – С. 20–26.

2. Kaja S. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, P. Koulen // Current Protocols in Toxicology. – 2017. – Vol. 72, Issue 1. – P. 2.26.1–2.26.10.

3. Kaja S. Plate reader-based cell viability assays for glioprotection using primary rat optic nerve head astrocytes / S. Kaja, A. J. Payne, **Y. Naumchuk**, D. Levy, D. H. Zaidi, A. M. Altman, S. Nawazish, J. K. Ghuman, B. C. Gerdes, M. A. Moore, P. Koulen // Experimental Eye Research. – 2015. – Vol. 138. – P. 159–166.

## РОЗДІЛ 5

### ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ СТАНДАРТИЗОВАНОЇ ТА ВАЛІДОВАНОЇ ПЛАТФОРМИ ДЛЯ ТЕСТУВАННЯ ГЛІОПРОТЕКТОРНИХ СПОЛУК

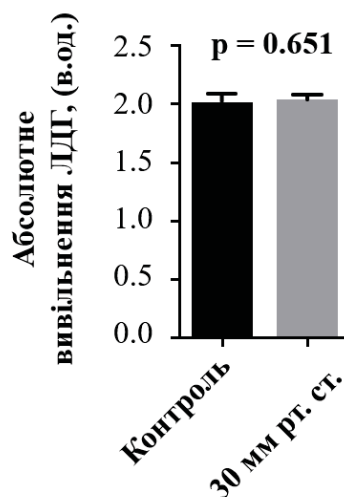
#### **5.1 Експозиція в умовах підвищеного тиску сенсibiliзує клітини первинної культури АГЗН до подальшої дії оксидативних чинників**

У попередньому розділі ми розглянули комплекс протоколів для скринінгу гліопротекторних сполук на основі визначення життєздатності клітин первинної культури АГЗН в умовах оксидативного стресу. Далі ми вирішили використати нашу методологію для перевірки антиоксидантного захисту АГЗН за умов реактивного астроцитозу, індукованого ГБТ (глаукоматозний стан). Показано, що підвищений внутрішньоочний тиск при глаукомі викликає патологічні зміни в астроцитах, відомі як реактивний астроцитоз (див. рис. 1.1). Реактивний астроцитоз – це фізіологічний механізм, який характеризується підвищеною проліферацією астроцитів, гіпертрофією клітин, подовженням клітинних відростків та супутнім збільшенням експресії GFAP. По суті, у всіх типах глаукоми реактивний астроцитоз є основним механізмом, що відповідає за ремоделінг ГЗН.

Для визначення життєздатності АГЗН ми використовували попередньо описаний метод оцінки вивільнення ЛДГ. Для того, щоб викликати стан, який імітує підвищений ВОТ, нами разом з Dr. Evan Stubbs було розроблено гіпербаричну камеру тиску. Ця система, яка включала також моніторинг тиску та складу контрольованого газового середовища і була розміщена у звичайному інкубаторі для культивування тканин, надавала нам можливість контролювано збільшувати тиск до 60 мм рт. ст.

Спочатку ми піддали клітини дії тиску 30 мм рт. ст. протягом 16 год (протягом ночі) з наступним вимірюванням вивільнення ЛДГ.

Кількісне визначення абсолютного вивільнення ЛДГ не виявило жодної різниці у життєздатності контрольних АГЗН та АГЗН після 16-годинної експозиції в умовах підвищеного тиску (рис. 5.1). Таким чином, сам по собі підвищений тиск не змінює життєздатності клітин первинної культури АГЗН у разі короткочасного впливу.



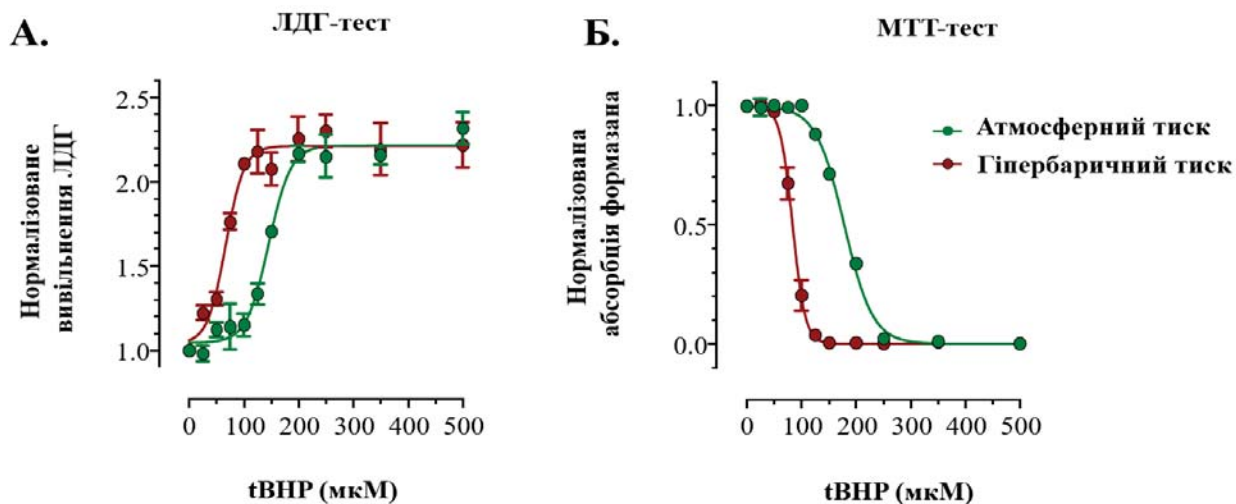
**Рис. 5.1** – Вплив гіпербаричного тиску на життєздатність АГЗН за результатами аналізу життєздатності за вивільненням ЛДГ.

Вплив ГБТ (30 мм рт. ст. протягом 16 год) не змінив життєздатності клітин.

Абсолютне вивільнення ЛДГ було незмінним ( $n = 48$ ;  $p = 0,651$ )

Далі необхідно було дослідити, чи може підвищений тиск змінити реакцію клітин на хімічно індукований (tBHP) оксидативний стрес. Наші дослідження показали, що за результатами обох тестів – як МТТ-тесту, так і за даними кількісного визначення вивільнення ЛДГ – попередній гіпербаричний вплив (30 мм рт. ст. перед застосуванням індуктора оксидативного стресу tBHP (tBHP 0-500 мкМ, протягом 5 год) спричиняв більш суттєве зниження життєздатності АГЗН порівняно з клітинами АГЗН у контролі, які культивували в умовах нормального тиску, а саме, кількісний аналіз вивільнення ЛДГ показав зниження  $EC_{50}$  для tBHP з 145,5 до 67,8 мкМ, а за даними МТТ-тесту він змінився з 178,5 до 83,9 мкМ. Таким чином, хоча

підвищений тиск безпосередньо не впливає на життєздатність АГЗН, він сенсibiliзує їх до подальшої дії оксидативного стресу (рис. 5.2,  $n = 24$ ,  $p < 0,05$ ).



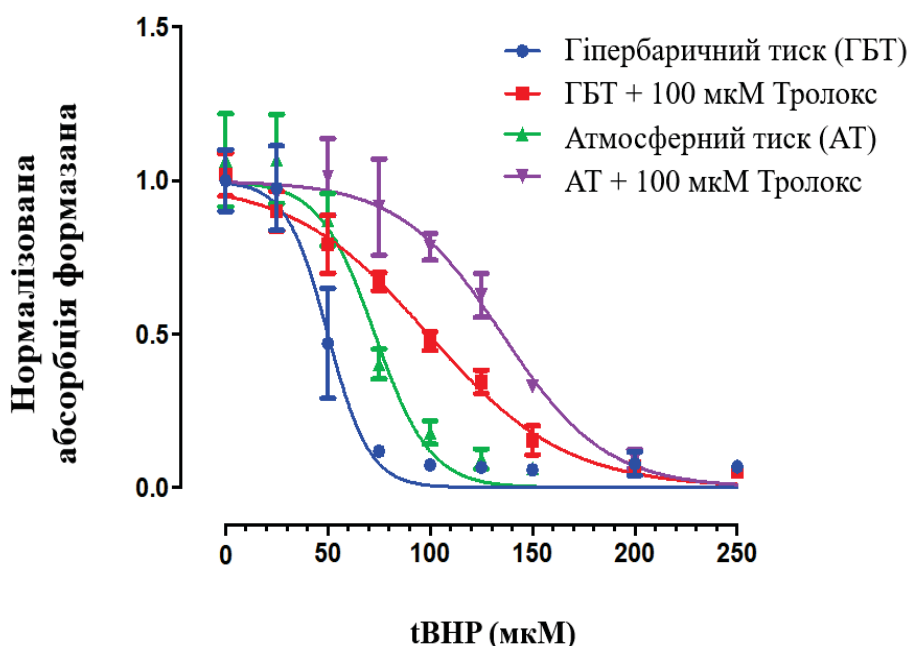
**Рис. 5.2** – Залежність життєздатності АГЗН від концентрації tBHP після інкубації при підвищеному та гіпербаричному тиску в тестах ЛДГ (А) і МТТ (Б),  $n = 24$ ,  $p < 0,05$ . Оцінка вивільнення ЛДГ та МТТ-тест показали зниження життєздатності АГЗН, спричинене ГБТ, у відповідь на хімічно індукований оксидативний стрес (tBHP 0-500 мкМ, протягом 5 год).

16-годинна інкубація з підвищеним ГБТ (30 мм рт. ст.) спричинила зниження  $EC_{50}$  для tBHP з 145,5 до 67,8 мкМ в аналізі вивільнення ЛДГ, та з 178,5 до 83,9 мкМ у МТТ-тесті

Наступні експерименти були поставлені, щоб за допомогою методів аналізу життєздатності клітин з'ясувати, чи здатний антиоксидант Тролокс запобігти сенсibiliзації, що викликана дією підвищеного тиску, до подальшого впливу чинників оксидативного стресу.

Для клітин первинної культури АГЗН, що піддавалися дії ГБТ, попередня обробка Тролоксом зсунула криву вправо, збільшуючи  $EC_{50}$  для tBHP від 50 до 99,1 мкМ. Аналогічним чином, для АГЗН, які культивували

при атмосферному тиску, Тролокс збільшив  $EC_{50}$  для tBHP від 73 до 135,2 мкМ,  $n = 24$ ,  $p < 0.05$  (рис 5.3, табл. 5.1).



**Рис. 5.3** – Тролокс перешкоджає підвищенню чутливості клітин, що викликана ГБТ, до подальшого впливу оксидативного стресу.

Застосовували Тролокс або, для порівняння, розчинник (0,1% етанол) за 1 год до та протягом експозиції з індуктором оксидативного стресу tBHP.

Тролокс однаково зміщував значення  $E_{50}$  для клітин, які культивувалися в умовах атмосферного тиску та для тих, що зазнали гіпербаричного впливу,

$$n = 24, p < 0,05$$

Оскільки механізм, за яким ГБТ спричиняв збільшення чутливості клітин первинної культури АГЗН до хімічно індукovanого оксидативного стресу, був незрозумілим, ми висунули гіпотезу, що причиною цього може бути збільшення базового рівня активних форм кисню у клітинах. Для того, щоб визначити, чи справді гіпербаричний вплив спричиняє пряме підвищення рівня оксидативного стресу, ми використали окремі методики для кількісної оцінки продуктів оксидативного стресу. По-перше, для візуалізації рівня оксидативного стресу методом мікроскопії було



використано барвник Cellroх® Green Reagent (Thermo Fisher), який здатний проникати до клітини. Cellroх® у відновленому стані є речовиною, яка флуоресціює доволі слабо, проте після окиснення РФК та наступного зв'язування з ДНК, CellROX® демонструє яскраво-зелену фотостабільну флуоресценцію з максимумами поглинання та емісії близько 485 нм та 520 нм відповідно. Однією з основних переваг CellROX® є те, що цей барвник може бути фіксований формальдегідом та дозволяє виконувати обробку детергентами, наприклад, для підвищення проникності клітин, що робить його сумісним з іншими флуоресцентними барвниками з відповідними спектрами збудження та емісії, тим самим уможливлуючи одночасне фарбування кількома флуоресцентними барвниками за допомогою стандартних протоколів імунофлуоресценції.

Таблиця 5.1

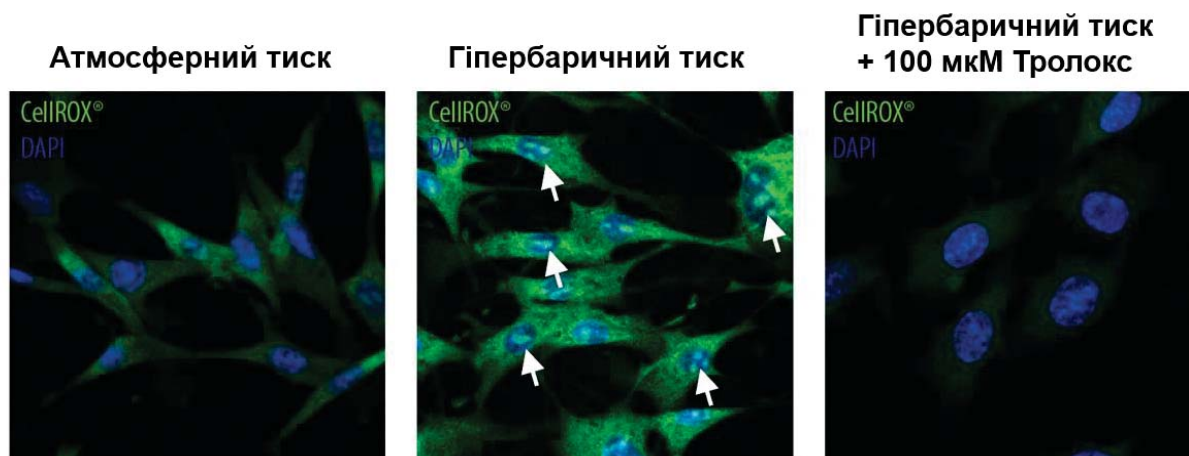
**Параметри, отримані за допомогою нелінійного  $t$  для МТТ-тесту  
(кількість повторів  $n = 24$ )**

Показник	Вплив			
	ГБТ	ГБТ + 100 мкМ Тролокс	Атмосферний тиск (АТ)	АТ + 100 мкМ Тролокс
EC <sub>50</sub> для tВНР, мкМ	50,0 ± 1,9	99,1 ± 2,2	73,0 ± 2,4	135,2 ± 2,6
R <sup>2</sup>	0,946	0,980	0,954	0,975

Застосування Тролоксу збільшило EC<sub>50</sub> для tВНР від 50 до 99,1 мкМ в культурі АГЗН, які культивували при ГБТ, та від 73 до 135,2 мкМ для АГЗН, які культивували при атмосферному тиску. Дані подано як  $M \pm SE$  для трьох різних експериментів з вісьмома технічними контролюми у кожному.

Мікроскопічне дослідження клітин первинної культури АГЗН, забарвлених реагентом CellROX®, показало підвищений рівень флуоресценції CellROX® після 16-годинної інкубації в гіпербаричних

умовах при тиску 25 мм рт. ст., що свідчить про збільшення генерації РФК. Крім того, АГЗН, інкубовані в гіпербаричних умовах, показали високу флуоресценцію CellROX, локалізовану в ядрах, що свідчить про зв'язування реагенту з клітинною ДНК та підтверджує збільшення продукції РФК (рис. 5.4).

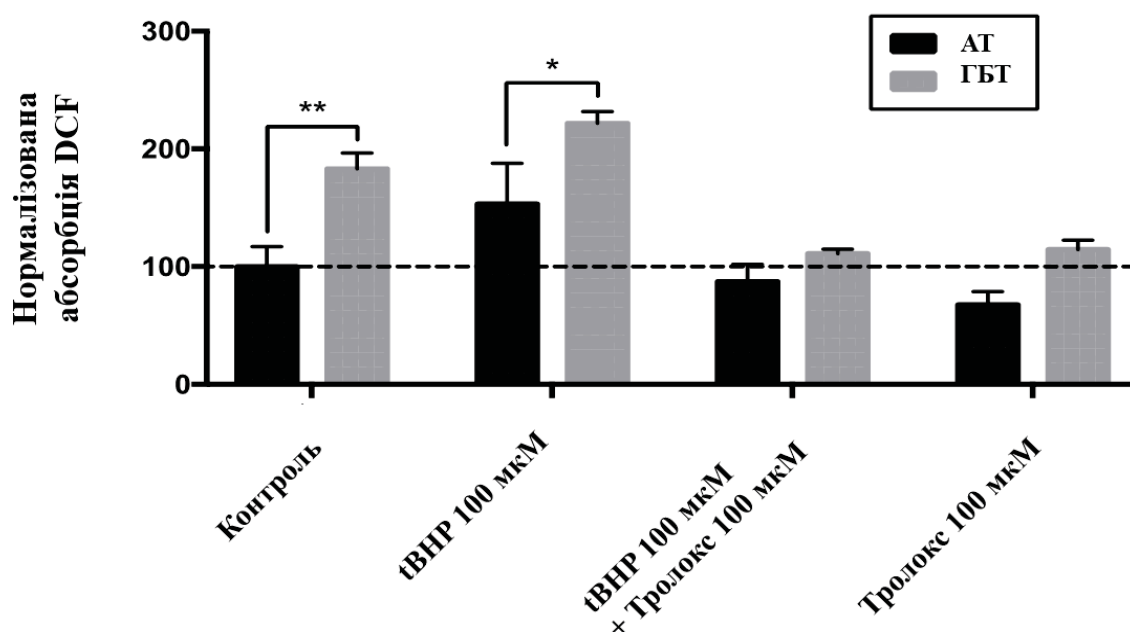


**Рис. 5.4** – Репрезентативне зображення АГЗН при забарвленні реагентом CellROX (зелений). Клітинні ядра забарвлені барвником DAPI (синій). Гіпербаричний тиск викликає підвищення рівня РФК у первинній культурі АГЗН. Сильну CellROX флуоресценцію ядер позначено білими стрілками. Первинна обробка 100 мкМ Тролоксом запобігає генерації РФК унаслідок підвищеного тиску

Таким чином, ГБТ збільшує продукцію РФК у клітинах первинної культури АГЗН, що підвищує їхню чутливість до подальшого хімічно індукованого оксидативного стресу. Для того, щоб з'ясувати, чи може антиоксидантне лікування запобігти підвищенню продукції РФК унаслідок дії ГБТ, ми використовували 100 мкМ Тролокс. Як ми й очікували, попередня обробка з Тролоксом повністю запобігла генерації РФК унаслідок дії ГБТ.

Для того, щоб кількісно оцінити ефект дії ГБТ на продукцію РФК, ми поставили окремий експеримент, в якому АГЗН піддавали дії ГБТ (30 мм рт. ст.) протягом 2 год після попередньої обробки клітин

сублетальною концентрацією tBHP (100 мкМ) та / або Тролоксу (100 мкМ). Кількісну оцінку рівня РФК виконували із застосуванням мембранопроникного флуоресцентного індикатора РФК DCFDA. Встановлено, що гіпербаричний вплив спричиняв суттєве підвищення рівня РФК до значень, порівнянних з експозицією із сублетальними дозами tBHP, тоді як Тролокс повністю запобігав генерації РФК як унаслідок дії ГБТ, так і tBHP-індукованій (рис. 5.5,  $n = 24$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ ).



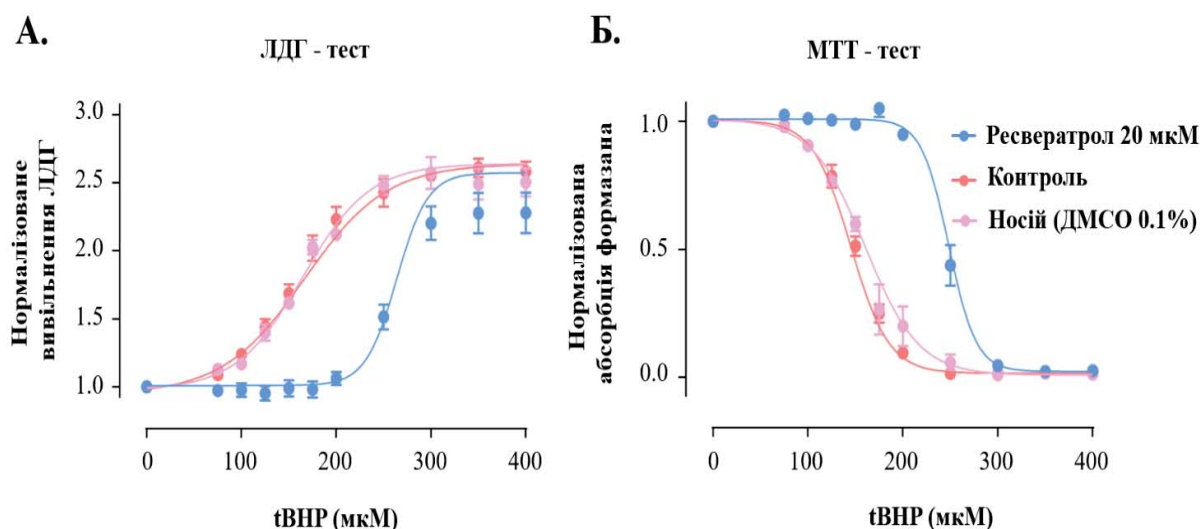
**Рис. 5.5** – Гіпербаричний вплив спричиняє суттєве підвищення рівня РФК до значень, порівнянних з експозицією із сублетальними дозами tBHP, тоді як Тролокс повністю запобіг генерації РФК як унаслідок гіпербаричного тиску, так і tBHP-індукованій,  $n = 24$ ,  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$

Таким чином, нами встановлено, що гіпербаричний тиск підвищує чутливість клітин первинної культури АГЗН до хімічно індукованого оксидативного стресу за рахунок збільшення базового рівня продукції РФК. Попередня обробка 100 мкМ розчином антиоксиданта Тролоксу дозволяла цьому успішно запобігти.

## **5.2 Ресвератрол захищає клітини первинної культури АГЗН від дії оксидативних чинників**

Наступним етапом роботи стало використання нашої платформи для дослідження на клітинах первинної культури АГЗН гліопротекторних властивостей потенційних кандидатів у фармацевтичні препарати. Спочатку ми вирішили протестувати нутрицевтичний агент Ресвератрол, який, за даними літератури, охарактеризовано як сполуку з антиоксидантними та протизапальними властивостями [101]. Дослідження терапевтичних ефектів Ресвератролу при глаукомі показали, що прийом цього препарату з їжею знижував рівень внутрішньоклітинної продукції РФК та маркерів запалення у клітинах трабекулярної сітки в умовах хронічного оксидативного стресу. Дослідження Luna et al., 2009 [102] свідчать про наявність антиоксидантної та антиапоптичної дії Ресвератролу у клітинах трабекулярної сітки. Інші дослідження показали, що Ресвератрол у комбінації з іншим нейропротекторним препаратом рилазолом проявляє значний нейропротекторний ефект, підвищуючи виживаність ГКС в експериментальній моделі глаукоми на щурах [103].

Тому ми використали нашу платформу для вивчення гліопротекторного потенціалу Ресвератролу. Первинну культуру АГЗН обробляли 20 мкМ Ресвератролом або, для порівняння, розчинником (0,1 % ДМСО) протягом 1 год перед впливом хімічно індукованого оксидативного стресу. За нашими даними, Ресвератрол показав значний гліопротекторний ефект, зміщуючи  $EC_{50}$  для tVNP з 145,3 мкМ до 248,4 мкМ в аналізі вивільнення ЛДГ, та з 166,5 до 263,8 мкМ в МТТ-тесті (рис. 5.6,  $n = 24$ ,  $p < 0,05$ ).



**Рис. 5.6** – Ресвератрол захищає клітини первинної культури АГЗН від впливу оксидативного стресу: А – кількісний аналіз вивільнення ЛДГ; Б – дані МТТ-тесту. За результатами аналізу вивільнення ЛДГ значення  $EC_{50}$  для tVHP підвищилось з 145,3 до 248,4 мкМ; за даними МТТ-тесту значення  $EC_{50}$  для tVHP підвищилось з 166,5 до 263,8 мкМ,  $n = 24$ ,  $p < 0,05$

Таким чином, наша методологія була додатково підтверджена в експерименті з відомою антиоксидантною сполукою Ресвератролом. Ми також показали, що, крім нейропротекторних властивостей, Ресвератрол може також використовуватися як гліопротекторний агент.

## Висновки до розділу 5

У цьому розділі ми застосували нашу платформу для вивчення впливу ГБТ на клітини первинної культури АГЗН. Наші дані свідчать про те, що сам підвищений тиск безпосередньо не змінює життєздатності клітин, проте він суттєво сенсibiliзує клітини первинної культури АГЗН до подальшого оксидативного стресу внаслідок підвищення базового рівня продукції РФК. При інкубації клітин первинної культури АГЗН в умовах підвищеного тиску (30 мм рт. ст.) ми спостерігали зниження життєздатності клітин зі зниженням показника  $EC_{50}$  для tBHP з 145,5 до 67,8 мкМ за даними кількісного аналізу вивільнення ЛДГ, та з 178,5 до 83,9 мкМ за даними МТТ-тесту. Застосування антиоксидантного препарату Тролокс дозволяло успішно цьому запобігти. При застосуванні Тролоксу показник  $EC_{50}$  для tBHP підвищувався з 50,0 до 99,1 мкМ за умов дії підвищеного тиску та з 73,0 до 135,2 мкМ в разі інкубації клітин первинної культури АГЗН при атмосферному тиску (дані МТТ-тесту).

Нарешті, ми використали нашу методологію, щоб охарактеризувати іншу антиоксидантну сполуку – нутрицевтичний препарат Ресвератрол. Продемонстровано здатність Ресвератролу захищати АГЗН, що підтверджується підвищенням показника  $EC_{50}$  для tBHP з 145,3 до 248,4 мкМ за даними кількісного аналізу вивільнення ЛДГ, та з 166,5 до 263,0 мкМ за даними МТТ-тесту.

**Результати, отримані у цьому розділі, опубліковано у таких працях:**

1. Kaja S. Intracellular signaling in astrocytes in response to elevated hydrostatic pressure / S. Kaja, V. R. Rao, **Y. Naumchuk**, A. J. Payne // Society for Neuroscience Annual Meeting. – Washington, D.C., 2017.

**РОЗДІЛ 6**

**ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗНА СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ**

**ГЛІОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АНТИОКСИДАНТНИХ**

**РЕЧОВИН**

**(ЗАГАЛЬНЕ ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ)**

У роботі представлено набір протоколів, призначених для швидкої розробки та адаптації високопродуктивної платформи для скринінгу гліопротекторних сполук для лікування глаукоми.

У третьому розділі описано розробку стандартизованого методу виділення та підтримки первинної культури астроцитів зорового нерва дорослих щурів – спеціалізованих клітин ГЗН, які уражаються при глаукомній патології. На відміну від існуючих, раніше розроблених протоколів, як джерело АГЗН використовували дорослих коричневих норвезьких щурів, що забезпечило кращу модель для вивчення вікових патологій, таких як глаукома, порівняно з неонатальною або ранньою постнатальною тканинною культурою. Було отримано первинну культуру АГЗН з єдиною морфологією, не контаміновану клітинами неастроцитних типів, та було визначено оптимальний склад середовища, яке забезпечує найкращі умови росту і проліферації АГЗН. При культивуванні АГЗН у середовищі Ігла, модифікованому за способом Дульбекко, доповненому 4500 мг/л глюкози та 20 % FBS, без пірувату, отримано криві росту з найнижчою варіабельністю. Проведена перевірка впливу пересіву клітин до 15 пасажів та багаторазового заморожування не виявила змін морфологічних та функціональних властивостей АГЗН, що надає важливу перевагу при їх використанні у платформі для скринінгу гліопротекторів. Ще одним важливим висновком було визначення оптимального субстрату для росту АГЗН на поверхні покривних скелець. В експериментах, які вимагали прикріплення клітин до поверхні, встановлено, що найкращим покриттям підкладки для АГЗН є полі-L-лізин, для якого показано



найменший час подвоєння – 22 год, та найнижча варіабельність. Це може бути особливо важливим для розробки платформ для тестування гліопротекторних сполук, в яких часто необхідно прикріплення клітин до поверхні. Таким чином, нам вдалося отримати первинну культуру АГЗН щурів з морфологічними та функціональними властивостями, що роблять її придатною для скринінгу гліопротекторних сполук для лікування глаукоми.

У четвертому розділі нами валідовано відтворюваний ЛДГ-метод, оптимізований для культури АГЗН. На відміну від комерційних тест-систем, наш метод вивільнення ЛДГ має відому формулу, що забезпечує додаткові можливості його оптимізації для специфічних умов та клітинних ліній. Крім того, загальна вартість нашого ЛДГ-тесту була в 50 разів нижчою порівняно з комерційним тестом. Оскільки генерація оксидативного стресу є важливою патофізіологічною ланкою розвитку глаукоми, ми протестували чутливість первинної культури АГЗН до пошкоджувальної дії оксидативного стресу. Нами доведено, що екзогенний оксидативний стрес, хімічно індукований шляхом обробки зростаючими концентраціями tBHP, спричиняє помітне збільшення рівня РФК в культурі АГЗН, який ми оцінювали за допомогою флуоресценції DCFDA та супутнього збільшення вивільнення ЛДГ як додаткового маркера життєздатності клітин. Крім того, для культури АГЗН ми створили оптимізовані протоколи для МТТ-тесту та аналізу поглинання кальцеїну, які є додатковими тестами для кількісної оцінки життєздатності клітин, що ґрунтуються на різних аспектах клітинної фізіології, а саме на активності мітохондріальної редуктази та цитозольних естераз відповідно. Важливо, що кількісне визначення  $EC_{50}$  для tBHP показало порівнянні значення для всіх використаних методів оцінки життєздатності клітин, з відмінностями відповідно до активності різних ферментів. Зокрема,  $EC_{50}$  tBHP для АГЗН при дослідженні рівня РФК у DCFDA-тесті становила  $(192,1 \pm 15,7)$  мкМ. Подібні результати оцінки дії хімічного індуктора оксидативного стресу на клітини первинної культури АГЗН було отримано також у тесті поглинання кальцеїну-АМ, при аналізі вивільнення ЛДГ та

в МТТ-тесті, що забезпечує низьку варіабельність показників визначення цитотоксичності у відповідь на оксидативний стрес. Оцінка життєздатності клітин АГЗН після оксидативного стресу, індукованого tВНР, показала  $EC_{50} = (156,9 \pm 3,8)$  мкМ у дослідженні поглинання кальцеїну-АМ. За даними МТТ-тесту та аналізу вивільнення ЛДГ значення  $EC_{50}$  для tВНР становили  $(138,1 \pm 1,4)$  та  $(146,9 \pm 4,9)$  мкМ відповідно. Далі ми тестували антиоксидант Тролокс як прототипний антиоксидантний препарат, щоб оцінити доцільність антиоксидантного втручання у нашій стандартній платформі тестування. Тролокс (100 мкМ) підвищував значення  $EC_{50}$  до  $(192,7 \pm 2,8)$  і  $(246,3 \pm 7,3)$  мкМ в МТТ-тесті та в аналізі вивільнення ЛДГ, відповідно, що свідчить про сильний антиоксидантний ефект.

У п'ятому розділі ми вивчили вплив гіпербаричного тиску на клітини первинної культури АГЗН, використовуючи клітини та методологію, отриману в попередніх розділах. Ми виявили, що за даними оцінки абсолютного рівня вивільнення ЛДГ, ГБТ безпосередньо не впливає на життєздатність АГЗН, однак гіпербаричний вплив значно підвищував сенсibiliзацію первинних культур АГЗН до наступного впливу оксидативного стресу. У клітинах первинної культури АГЗН, які піддавали дії ГБТ 30 мм рт. ст. протягом 20 год, ми спостерігали зниження життєздатності після подальшого впливу tВНР, що впливає із зареєстрованого зміщення  $EC_{50}$  для tВНР з 145,5 до 67,8 мкМ в аналізі ЛДГ та з 178,5 до 83,9 мкМ у МТТ-тесті. Ці ефекти були частково зменшені застосуванням антиоксидантного засобу Тролокс, який збільшив  $EC_{50}$  для tВНР з 50 до 99,1 мкМ за умови ГБТ та від 73 до 135,2 мкМ для умов зовнішнього тиску. Аналізуючи можливі причини часткової відміни ефекту ГБТ ми припустили, що підвищений тиск може збільшувати рівень внутрішньоклітинних РФК. Подальші експерименти, описані в цьому розділі, показали, що в основі цієї сенсibiliзації АГЗН до оксидативного стресу лежить збільшення базового рівня продукції РФК в АГЗН після впливу ГБТ.

Нарешті, ми використали нашу методологію, щоб охарактеризувати Ресвератрол, нутрицевтик із сильними протизапальними та антиоксидантними властивостями. Ресвератрол надав потужний захист АГЗН, що ми зареєстрували за зміною  $EC_{50}$  для tVHP з 145,3 до 248,4 мкМ в аналізі вивільнення ЛДГ та з 166,5 до 263 мкМ у МТТ-тесті. Протекторна дія Ресвератролу виявилась більш сильною, ніж дія Тролокса, та не була пропорційною базовому рівню оксидативного стресу в клітинах, підтверджуючи попередні дослідження, в яких було виявлено інший механізм дії Ресвератролу порівняно з Тролоксом, який є скавенджером РФК.

Таким чином, результати нашої роботи є підґрунтям для використання первинної культури АГЗН щурів та планшетних тестів для дослідження нових потенційних фармацевтичних препаратів для лікування глаукоми та розладів ЗН та ГЗН. Крім того, розроблені нами нові стандартизовані протоколи можуть бути легко конвертовані у високопродуктивні скринінгові платформи.

У результаті виконаних досліджень було розроблено і науково обґрунтовано лактатдегідрогеназну систему для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерва, наведену в табл. 6.1.

У табл. 6.1 наведене покрокове виконання розробленої технології з визначенням завдання кожного етапу, засобів і методів, необхідних для вирішення поставленої задачі, технологічних умов та критеріїв досягнення мети кожного етапу. Ця таблиця є узагальненням розробленої технології визначення гліопротекторних властивостей антиоксидантних речовин.

Таблиця 6.1

**Характеристики лактатдегідрогеназної тест-системи  
для діагностики гліопротекторних властивостей  
фармакологічних субстанцій для лікування глаукоми**

<b>Засоби та методики</b>	<b>Технологічні умови</b>	<b>Завдання етапу та критерії оцінки (дотримання зазначених технологічних умов)</b>
Методи культивування культури тваринних клітин	<i>Середовище культивування АГЗН:</i> DMEM із 4500 мг/л глюкози, 20 % ембріональної сироватки телят без додавання пірувату, рН 7,4	Підтримання життєздатної культури АГЗН
	<i>Умови культивування АГЗН:</i> 37 °С, 5 % CO <sub>2</sub> , відносна вологість 95 %	
Імуно-цитохімічне забарвлення АГЗН, конфокальна мікроскопія	<i>Покриття поверхні скельця для культивування АГЗН:</i> полі-L-лізин.	Імуноцитохімічне підтвердження приналежності АГЗН за наявністю маркерів EAAT1, GFAP, S100b
Методи культивування культури тваринних клітин, інкубація АГЗН с агентом оксидативного стресу	<i>Модельна система тестування:</i> культура первинних АГЗН щура	Проведення першого етапу ЛДГ тесту: індукція оксидативного стресу в АГЗН
	<i>Матриця:</i> 96-лунковий планшет	
	<i>Початкова кількість культивованих клітин:</i> суспензія із розрахунку 7500 клітин на лунку планшета	
	<i>Час культивування перед індукцією оксидативного стресу:</i> 48 год	
	<i>Час інкубації з індуктором оксидативного стресу tBHP:</i> 5 год	

Продовж. табл. 6.1

Засоби та методики	Технологічні умови	Завдання етапу та критерії оцінки (дотримання зазначених технологічних умов)
Відбирання зразків супернатанту АГЗН та їх інкубація з тест-реагентом ЛДГ-тесту	<i>Об'єм зразка супернатанта:</i> 50 мкл	Проведення другого етапу ЛДГ-тесту: проведення спряжених реакцій перетворення лактату в піруват лактатдегідрогеназою, відновлення НАД <sup>+</sup> до НАД(Н), та перетворення йодонітротетразолій хлориду у формазан
	<i>Склад тест-реагенту:</i> 2 мкМ INT, 3,2 мМ β-натрієва сіль нікотинамід аденін динуклеотиду, 160 мМ лактат літію, 7 мкМ MPMS в 0,2 М Трис-НСІ, рН 8,2	
	<i>Час інкубації з тест-реагентом:</i> 1 година	
	<i>Об'єм тест-реагенту:</i> 50 мкл	
Методи оптичної колориметрії	<i>Стоп-реагент:</i> 1 М оцтова кислота	Проведення третього етапу ЛДГ-тесту: зупинка реакції, вимірювання оптичної абсорбції та ідентифікація життєздатності АГЗН
	<i>Об'єм стоп-реагенту:</i> 50 мкл	
	<i>Час інкубації з тест-реагентом:</i> 15 с	
	<i>Довжина хвилі вимірювання оптичної абсорбції:</i> 490 нм	

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і показано нові шляхи вирішення наукової задачі, що стосується розробки біотехнологічного методу ефективної оцінки гліопротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій перспективних щодо лікування глаукоми. Результати досліджень дають змогу зробити такі висновки:

1. Розроблено технологію отримання первинної культури АГЗН із підтвердженою імуноцитохімічними маркерами чистотою культури для моделювання умов розвитку глаукоми. Експериментально підтверджено, що оптимальною поверхнею для росту культури АГЗН є полі-L-лізин, який забезпечував найкоротший термін подвоєння (22 год), і найменшу варіабельність параметрів росту при температурі 37 °С, відносній вологості 95 % та концентрації CO<sub>2</sub> 5 % на живильному середовищі DMEM із вмістом 4500 мг/л глюкози, 20 % FBS без додавання пірувату.

2. Розроблено модифікацію тесту вивільнення ЛДГ, що придатна для АГЗН, засновану на оптимальному періоді першої інкубації протягом 5 год з оксидативним агентом tBHP у діапазоні концентрацій від 0 до 250 мкМ та другій інкубації протягом 1 год з реагентами для проявлення (2 мкМ йодонітротетразолій хлорид, 3,2 мМ β-натрієва сіль нікотинамідаденіндинуклеотиду, 160 мМ лактат літія, 7 мкМ 1-метокси-феназин метосульфат в 0,2 М Трис-HCl, pH 8,2).

3. Ефективність використання tBHP як оксидативного агента в культурі АГЗН була визначена за допомогою тесту на присутність реактивних форм кисню (DCFDA), де напівмаксимальна ефективна концентрація tBHP EC<sub>50</sub> склала 192,1 мкМ, та тестів виживання клітин (кальцеїн-АМ та МТТ), у яких EC<sub>50</sub> склала 156,9 та 138,1 мкМ ( $p < 0,05$ ) відповідно. Це підтвердило ефективність tBHP як індуктора оксидативного стресу для моделювання пошкодження АГЗН.

4. Було виявлено підвищення реактивних форм кисню в АГЗН під час реактивного астроцитозу під впливом гіпербаричного тиску. Тому як альтернатива гіпербаричній дії було обрано екзогенно індукований оксидативний стрес з використанням tBHP як репрезентативну модель для дослідження на експериментальній скринінговій платформі сполук з гліпротекторним терапевтичним потенціалом.

5. Порівняння розробленої системи тестів з існуючими методиками визначення ступеня оксидативного стресу підтверджує її високу інформативність для визначення гліпротекторного потенціалу фармакологічних субстанцій. Не виявлено достовірних відмінностей при тестуванні Тролокс: у тесті ЛДГ (tBHP:  $EC_{50} = 246,3$  мкМ) і в тесті МТТ (tBHP:  $EC_{50} = 192,7$  мкМ). Для Ресвератролу – в тесті ЛДГ (tBHP:  $EC_{50} = 248,4$  мкМ) і в тесті МТТ (tBHP:  $EC_{50} = 263,8$  мкМ). Доведено, що розроблена платформа ЛДГ тестування не поступається за точністю отриманих результатів загальноприйнятим методикам і перевершує їх за простотою та економічністю. Результати роботи дозволяють рекомендувати розроблену платформу ЛДГ-тестування для практичного використання.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Casson R. J. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts / R. J. Casson et al. // Clin Exp Ophthalmol. – 2012. – Vol. 40, Issue 4. – P. 341–349.
2. Foster P. J. The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys / P. J. Foster et al. // Br J Ophthalmol. – 2002. – Vol. 86, Issue 2. – P. 238–242.
3. Quigley H. A. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 / H. A. Quigley and A. T. Broman // Br J Ophthalmol. – 2006. – Vol. 90, Issue 3. – P. 262–267.
4. Bettin P. Glaucoma: present challenges and future trends / P. Bettin and F. Di Matteo // Ophthalmic Res. – 2013. – Vol. 50, No. 4. – P. 197–208.
5. Chang E. Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement / E. Chang and J. Goldberg // Ophthalmology. – 2012. – Vol. 119, Issue 5. – P. 979–986.
6. Farkas R. H. Apoptosis, neuroprotection, and retinal ganglion cell death: an overview / R. H. Farkas and C. L. Grosskreutz // Int Ophthalmol Clin. – 2001. – Vol. 41, No. 1. – P. 111–130.
7. Noh Y. H. Inhibition of oxidative stress by coenzyme Q10 increases mitochondrial mass and improves bioenergetic function in optic nerve head astrocytes [Electron. resource] / Y. H. Noh et al. // Cell Death Dis. – 2013. – Vol. 4, No. 10. – e820. – 12 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824651/pdf/cddis2013341a.pdf>
8. Qu J. The Time Course of Gene Expression during Reactive Gliosis in the Optic Nerve [Electron. resource] / J. Qu and T. C. Jakobs // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, Issue 6. – e67094. – 19 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3694957/pdf/pone.0067094.pdf>

9. Burroughs S. Quantification of deficits in spatial visual function of mouse models for glaucoma / S. Burroughs, S. Kaja and P. Koulen // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – Vol. 52, No. 6. – P. 3654–3659.
10. Prokai-Tatrai K. 17 $\beta$ -estradiol eye drops protect the retinal ganglion cell layer and preserve visual function in an in vivo model of glaucoma / K. Prokai-Tatrai et al. // *Mol Pharm.* – 2013. – Vol. 10, No. 8. – P. 3253–3261.
11. Mozaffarieh M. New insights in the pathogenesis and treatment of normal tension glaucoma / M. Mozaffarieh and J. Flammer // *Curr Opin Pharmacol.* – 2013. – Vol. 13, Issue 1. – P. 43–49.
12. Mi X. Progressive retinal degeneration in transgenic mice with overexpression of endothelin-1 in vascular endothelial cells / X. Mi et al. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2012. – Vol. 53, Issue 8. – P. 4842–4851.
13. Hernandez M. R. The optic nerve head in glaucoma: role of astrocytes in tissue remodeling / M. R. Hernandez // *Prog Retin Eye Res.* – 2000. – Vol. 19, Issue 3. – P. 297–321.
14. Morrison J. Pathophysiology of human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma / J. Morrison, W. O. Cepurna Ying Guo and E. Johnson // *Exp Eye Res.* – 2011. – Vol. 93, Issue 2. – P. 156–164.
15. Weinreb R. N. The pathophysiology and treatment of glaucoma: a review / R. N. Weinreb, T. Aung and F. A. Medeiros // *JAMA.* – 2014. – Vol. 311, No. 18. – P. 1901–1911.
16. Agarwal R. Current concepts in the pathophysiology of glaucoma / R. Agarwal et al. // *Indian J Ophthalmol.* – 2009. – Vol. 57, Issue 4. – P. 257–266.
17. Sacca S. C. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma / S. C. Sacca et al. // *Arch Ophthalmol.* – 2005. – Vol. 123, No. 4. – P. 458–463.

18. Jonas J. B. Glaucoma / J. B. Jonas et al. // *Lancet*. – 2017. – Vol. 390, Issue 10108. – P. 2183–2193.
19. Quigley H. A. Glaucoma / H. A. Quigley // *Lancet*. – 2017. – Vol. 377, Issue 9774. – P. 1367–1377.
20. Weinreb R. N. Primary open-angle glaucoma [Electron. resource] / R. N. Weinreb et al. // *Nat Rev Dis Primers*. – 2016. – Vol. 2. – Access link: <https://www.nature.com/articles/nrdp201667>
21. Mohlin C. The link between morphology and complement in ocular disease / C. Mohlin et al. // *Mol Immunol*. – 2017. – Vol. 89. – P. 84–99.
22. King A. Glaucoma / A. King, A. Azuara-Blanco and A. Tuulonen // *BMJ*. – 2013. – Vol. 346. – P. f3518.
23. Giangiacomo A. L. Glaucoma / A. Giangiacomo A. L. Coleman; Editors S. R. Grehn F. // *The Epidemiology of Glaucom*. – Springer : Berlin; Heidelberg : Germany. – 2009. – P. 13–21.
24. Lee D. A. Glaucoma and its treatment: a review / D. A. Lee and E. J. Higginbotham // *Am J Health Syst Pharm*. – 2005. – Vol. 62, Issue 7. – P. 691–699.
25. Saito A. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia / A. Saito et al. // *Mol Neurobiol*. – 2005. – Vol. 31, Issue 1-3. – P. 105–116.
26. Murphy T. H. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress / T. H. Murphy et al. // *Neuron*. – 1989. – Vol. 2, Issue 6. – P. 1547–1558.
27. Albrecht P. Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target / P. Albrecht et al. // *CNS Neurol Disord Drug Targets*. – 2010. – Vol. 9, Issue 3. – P. 373–382.
28. Wang N. Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype / N. Wang et al. // *Nat Med*. – 2001. – Vol. 7, No. 3. – P. 304–309.

29. Izzotti A. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients / A. Izzotti et al. // *Am J Med.* – 2003. – Vol. 114, Issue 8. – P. 638–646.
30. Barbosa A. M. GSTM1 polymorphism in patients with primary open-angle glaucoma / A. M. Barbosa et al. // *Genet Mol Res.* – 2012. – Vol. 11, No. 3. – P. 3256–3262.
31. Ferreira S. M. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients / S. M. Ferreira et al. // *Am J Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 137, Issue 1. – P. 62–69.
32. Feilchenfeld Z. Oxidative injury to blood vessels and glia of the prelaminar optic nerve head in human glaucoma / Z. Feilchenfeld, Y. H. Yucel and N. Gupta // *Exp Eye Res.* – 2008. – Vol. 87, Issue 5. – P. 409–414.
33. McElnea E. M. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and calcium overload in human lamina cribrosa cells from glaucoma donors / E. M. McElnea et al. // *Mol Vis.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1182–1191.
34. Engin K. N. Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients / K. N. Engin et al. // *Mol Vis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1260–1271.
35. Erdurmus M. Antioxidant status and oxidative stress in primary open angle glaucoma and pseudoexfoliative glaucoma / M. Erdurmus et al. // *Curr Eye Res.* – 2011. – Vol. 36, Issue 8. – P. 713–718.
36. Chang D. The evaluation of the oxidative stress parameters in patients with primary angle-closure glaucoma [Electron. resource] / D. Chang et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, Issue 11. – e27218. – 6 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3214032/pdf/pone.0027218.pdf>
37. Heijl A. Reduction of intraocular pressure and glaucoma progression: results from the Early Manifest Glaucoma Trial / A. Heijl et al. // *Arch Ophthalmol.* – 2002. – Vol. 120, No. 10. – P. 1268–1279.

38. Chang E. E. Glaucoma 2.0: neuroprotection, neuroregeneration, neuroenhancement / E. E. Chang, and J. L. Goldberg // *Ophthalmology*. – 2012. – Vol. 119, No. 5. – P. 979–986.
39. Burroughs S. L. Quantification of deficits in spatial visual function of mouse models for glaucoma / S. L. Burroughs, S. Kaja and P. Koulen // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2011. – Vol. 52, No. 6. – P. 3654–3659.
40. Inman D. M. alpha-Lipoic acid antioxidant treatment limits glaucoma-related retinal ganglion cell death and dysfunction [Electron. resource] / D. M. Inman et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, Issue 6. – e65389. – 17 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3673940/pdf/pone.0065389.pdf>
41. Kaja S. Estrogen protects the inner retina from apoptosis and ischemia-induced loss of Vesl-1L / Homer 1c immunoreactive synaptic connections / S. Kaja et al. // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. – 2003. – Vol. 44, No. 7. – P. 3155–3162.
42. Prokai L. Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection / L. Prokai et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2003. – Vol. 100, No. 20. – P. 11741–11746.
43. Wilkinson D. A review of the effects of memantine on clinical progression in Alzheimer's disease / D. Wilkinson // *Int J Geriatr Psychiatry*. – 2012. – Vol. 27, No. 8. – P. 769–776.
44. Quigley H. A. Clinical trials for glaucoma neuroprotection are not impossible / H. A. Quigley // *Curr Opin Ophthalmol*. – 2012. – Vol. 23, Issue 2. – P. 144–154.
45. Osborne N. N. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned / N. N. Osborne // *Acta Ophthalmol*. – 2009. – Vol. 87, Issue 4. – P. 450–454.

46. Annweiler C. Possibility of a new anti-alzheimer's disease pharmaceutical composition combining memantine and vitamin D / C. Annweiler and O. Beauchet // *Drugs Aging*. – 2012. – Vol. 29, Issue 2. – P. 81–91.
47. Sozio P. Memantine-sulfur containing antioxidant conjugates as potential prodrugs to improve the treatment of Alzheimer's disease / P. Sozio et al. // *Eur J Pharm Sci*. – 2013. – Vol. 49, Issue 2. – P. 187–198.
48. Hu M. K. Homodimeric tacrine congeners as acetylcholinesterase inhibitors / M. K. Hu et al. // *J Med Chem*. – 2002. – Vol. 45, No. 11. – P. 2277–2282.
49. Li W. Novel dimeric acetylcholinesterase inhibitor bis7-tacrine, but not donepezil, prevents glutamate-induced neuronal apoptosis by blocking N-methyl-D-aspartate receptors / W. Li et al. // *J Biol Chem*. – 2005. – Vol. 280, No. 18. – P. 18179–18188.
50. Li W. Synergistic neuroprotection by bis (7)-tacrine via concurrent blockade of N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric-oxide synthase / W. Li et al. // *Mol Pharmacol*. – 2007. – Vol. 71, Issue 5. – P. 1258–1267.
51. Fang J. H. Neuroprotective effects of bis (7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage [Electron. resource] / J. H. Fang et al. // *BMC Neurosci*. – 2010. – Vol. 11, No. 31. – 9 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2838896/pdf/1471-2202-11-31.pdf>
52. Payne A. J. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina / A. J. Payne et al. // *Int J Mol Sci*. – 2014. – Vol. 15, No. 2. – P. 1865–1886.
53. Sun D. Structural remodeling of fibrous astrocytes after axonal injury / D. Sun et al. // *J Neurosci*. – 2010. – Vol. 30, Issue 42. – P. 14008–14019.
54. Hernandez M. R. Astrocytes in glaucomatous optic neuropathy / M. R. Hernandez, H. Miao and T. Lukas // *Prog Brain Res*. – 2008. – Vol. 173. – P. 353–373.

55. Kennedy P. G. Astrocytes and oligodendrocytes in dissociated cell culture of adult rat optic nerve / P. G. Kennedy and R. P. Lisak // *Neurosci Lett.* – 1980. – Vol. 16, Issue 3. – P. 229–233.
56. Mandal A. Hydrostatic pressure-induced release of stored calcium in cultured rat optic nerve head astrocytes / A. Mandal, M. Shahidullah and N. A. Delamere // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2010. – Vol. 51, Issue 6. – P. 3129–3138.
57. Lukas T. J. Isolation and culture of astrocytes from the retina and optic nerve / T. J. Lukas and A. L. Wang // *Methods Mol Biol.* – 2012. – Vol. 814. – P. 105–115.
58. Burroughs S. L. Plate reader-based assays for measuring cell viability, neuroprotection and calcium in primary neuronal cultures / S. Burroughs et al. // *J Neurosci Methods.* – 2012. – Vol. 203, Issue 1. – P. 141–145.
59. Ramirez C. N. Cell viability assessment: toward content-rich platforms / C. N. Ramirez, C. Antczak and H. Djaballah // *Expert Opin Drug Discov.* – 2010. – Vol. 5, Issue 3. – P. 223–233.
60. Gilbert D. F. A novel multiplex cell viability assay for high-throughput RNAi screening [Electron. resource] / D. F. Gilbert et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6, Issue 12. –e28338. – 10 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3230607/pdf/pone.0028338.pdf>
61. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *J Immunol Methods.* – 1983. – Vol. 65, Issue 1-2. – P. 55–63.
62. Riss T. L. Cell Viability Assays [Electron. resource] / T. L. Riss et al. // **Assay Guidance Manual** / editors G. S. Sittampalam et al. – 2004: Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. – P. 357–388. – Access link: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/BK53196/pdf/Bookshelf\\_NBK53196.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/BK53196/pdf/Bookshelf_NBK53196.pdf)



63. Marshall N. J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function / N. J. Marshall, C. J. Goodwin and S. J. Holt // *Growth Regul.* – 1995. – Vol. 5, No. 2. – P. 69–84.
64. Berridge M. V. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction / M. V. Berridge, P. M. Herst and A. S. Tan // *Biotechnol Annu Rev.* – 2005. – Vol. 11. – P. 127–152.
65. Berridge M. V. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction / M. V. Berridge and A. S. Tan // *Arch Biochem Biophys.* – 1993. – Vol. 303, No. 2. – P. 474–482.
66. Berridge M. V. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts / M. V. Berridge, A. S. Tan, K. D. McCoy, R. Wang // *Biochemica.* – 1996. – Vol. 4, No. 1. – P. 14–19.
67. Denizot F. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability / F. Denizot and R. Lang // *J Immunol Methods.* – 1986. – Vol. 89, Issue 2. – P. 271–277.
68. Tada H. An improved colorimetric assay for interleukin 2 / H. Tada, et al. // *J Immunol Methods.* – 1986. – Vol. 93, Issue 2. – P. 157–165.
69. Hansen M. B. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill / M. B. Hansen, S. E. Nielsen and K. Berg // *J Immunol Methods.* – 1989. – Vol. 119, Issue 2. – P. 203–210.
70. Plumb J. A. Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay / J. A. Plumb, R. Milroy and S. B. Kaye // *Cancer Res.* – 1989. – Vol. 49, Issue 16. – P. 4435–4440.

71. Nachlas M. M. The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt / M. M. Nachlas et al. // *Anal Biochem.* – 1960. – Vol. 1, Issues 4–5. – P. 317–326.
72. Vega-Avila E. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells / E. Vega-Avila and M. K. Pugsley // *Proc West Pharmacol Soc.* – 2011. – Vol. 54. – P. 10–14.
73. Stoddart M. J. Cell viability assays: introduction / M. J. Stoddart // *Methods Mol Biol.* – 2011. – Vol. 740. – P. 1–6.
74. Babson A. L. A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase / A. L. Babson and G. E. Phillips // *Clin Chim Acta.* – 1965. – Vol. 12, Issue 2. – P. 210–215.
75. Capps R. D. An automated colorimetric (tetrazolium salt) assay for serum lactate dehydrogenase / R. D. Capps et al. // *Clin Chem.* – 1966. – Vol. 12, Issue 7. – P. 406–413.
76. Raabo E. Determination of serum lactic dehydrogenase by the tetrazolium salt method / E. Raabo // *Scand J Clin Lab Invest.* – 1963. – Vol. 15, Issue 3. – P. 233–238.
77. Babson A. L. Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity / A. L. Babson and S. R. Babson // *Clin Chem.* – 1973. – 19, Issue 7. – P. 766–769.
78. Decker T. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity / T. Decker and M. L. Lohmann-Matthes // *J Immunol Methods.* – 1988. – Vol. 115, Issue 1. – P. 61–69.
79. Kendig D. M. Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for in vitro toxicology studies / D. M. Kendig and J. B. Tarloff // *Toxicol In Vitro.* – 2007. – Vol. 21, Issue 1. – P. 125–132.
80. Hoffman A. Ramifications of a redox switch within a normal cell: its absence in a cancer cell / A. Hoffman, L. M. Spetner and M. Burke // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol. 45, Issue 3. – P. 265–268.

81. Rothe G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein / G. Rothe and G. Valet // *J Leukoc Biol.* – 1990. – Vol. 47, No. 5. – P. 440–448.
82. Brewer G. J. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons / G. J. Brewer // *J Neurosci Methods.* – 1997. – Vol. 71, Issue 2. – P. 143–155.
83. Brewer G. J. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination / G. J. Brewer et al. // *J Neurosci Res.* – 1993. – Vol. 35, No. 5. – P. 567–576.
84. Nam Y. Development of astroglial cells in patterned neuronal cultures / Y. Nam, G. J. Brewer and B. C. Wheeler // *J Biomater Sci Polym Ed.* – 2007. – Vol. 18, Issue 8. – P. 1091–1100.
85. He Y. Growing and working with peripheral neurons / Y. He and P. W. Baas // *Methods Cell Biol.* – 2003. – Vol. 71. – P. 17–35.
86. Kaja S. Novel mechanism of increased  $\text{Ca}^{2+}$  release following oxidative stress in neuronal cells involves type 2 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors / S. Kaja et al. // *Neuroscience.* – 2011. – Vol. 175. – P. 281–291.
87. Kaja S. Distribution and function of polycystin-2 in mouse retinal ganglion cells / S. Kaja et al. // *Neuroscience.* – 2012. – Vol. 202. – P. 99–107.
88. Kaja S. Differential subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes / S. Kaja et al. // *Exp Neurol.* – 2015. – Vol. 265. – P. 59–68.
89. Kaja S. An optimized lactate dehydrogenase release assay for screening of drug candidates in neuroscience / S. Kaja et al. // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* – 2015. – Vol. 73. – P. 1–6.
90. Freshney R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications / R. I. Freshney. – 7ed. – 2016. – New Jersey: John Wiley & Sons, Incorporated. – 728 p.

91. Adami C. S100B expression in and effects on microglia / C. Adami et al. // *Glia*. – 2001. – Vol. 33, Issue 2. – P. 131–142.
92. Beschorner R. Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia / R. Beschorner et al. // *Histopathology*. – 2007. – Vol. 50, Issue 7. – P. 897–910.
93. Sofroniew M. V. Astrocytes: biology and pathology / M. V. Sofroniew and H. V. Vinters // *Acta Neuropathol*. – 2010. – Vol. 119, Issue 1. – P. 7–35.
94. Yang Z. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker / Z. Yang and K. K. W. Wang // *Trends Neurosci*. – 2015. – Vol. 38, Issue 6. – P. 364–374.
95. Chiba K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells / K. Chiba, K. Kawakami and K. Tohyama // *Toxicol In Vitro*. – 1998. – Vol. 12, Issue 3. – P. 251–258.
96. Fotakis G. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride / G. Fotakis and J. A. Timbrell // *Toxicol Lett*. – 2006. – Vol. 160, Issue 2. – P. 171–177.
97. Jauregui H. O. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes – Freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures / H. O. Jauregui et al. // *In Vitro*. – 1981. – Vol. 17, Issue 12. – P. 1100–1110.
98. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? / D. Lobner // *J Neurosci Methods*. – 2000. – Vol. 96, Issue 2. – P. 147–152.
99. Weyermann J. A practical note on the use of cytotoxicity assays / J. Weyermann, D. Lochmann and A. Zimmer // *Int J Pharm*. – 2005. – Vol. 288, Issue 2. – P. 369–376.

100. Takahashi S. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons / S. Takahashi et al. // *Neurochemistry international*. – 2002. – Vol. 40, Issue 5. – P. 441–448.
101. Abu-Amero K. K. Resveratrol and ophthalmic diseases [Electron. resource] / K. K. Abu-Amero, A. A. Kondkar and K. V. Chalam // *Nutrients*. – 2016. – Vol. 8, Issue 4. – 200. – 16 p. – Access link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848669/pdf/nutrients-08-00200.pdf>
102. Luna C. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells / C. Luna et al. // *Food Chem Toxicol*. – 2009. – Vol. 47, Issue 1. – P. 198–204.
103. Pirhan D. Riluzole- and resveratrol-induced delay of retinal ganglion cell death in an experimental model of glaucoma / D. Pirhan et al. // *Curr Eye Res*. – 2016. – Vol. 41, Issue 1. – P. 59–69.

## **ДОДАТОК А. АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ ТА АПРОБАЦІЇ**

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор

Національного технічного університету України

“Київський політехнічний інститут”

імені Ігоря Сікорського

академік НАН України, д.т.н, проф.

Ю.І. Якименко

2018 р.



### АКТ

про використання результатів дисертаційної роботи

Наумчук Юлії Анатоліївни

“Біотехнологічні основи лактатдегідрогеназної системи для  
тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву”

у навчальному процесі кафедри біомедичної інженерії

Національного технічного університету України

“Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського”

Ми, що нижче підписалися, комісія у складі: декан факультету біомедичної інженерії “КПІ ім. Ігоря Сікорського”, д.мед.н., проф. Максименко В.Б., в.о. зав. кафедри біомедичної інженерії, д.т.н., с.н.с., проф. Лебедєв О.В., доц. кафедри біомедичної інженерії, к.т.н., доц. Зубчук В.І., склали акт про використання результатів дисертаційної роботи здобувача аспірантури “КПІ ім. Ігоря Сікорського” Наумчук Юлії Анатоліївни “Біотехнологічні основи лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву” у навчальному процесі кафедри біомедичної інженерії, а саме:

у дисципліну “Основи біомедичної інженерії. Біоматеріали і біосумісність” до матеріалів лекції “Методики тестування фармакологічних субстанцій” увійшла порівняльна оцінка методик тестування фармакологічних субстанцій для захисту АГЗН з використанням прототипних антиоксидантів.

Декан факультету біомедичної інженерії

Максименко В.Б.

В.о. зав. каф. біомедичної інженерії

Лебедєв О.В.

Доц. кафедри біомедичної інженерії

Зубчук В.І.



**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Директор Інституту молекулярної  
біології і генетики НАН України  
академік НАН України



*[Signature]* А.В. Єльська

«*[Signature]*» \_\_\_\_\_ червня \_\_\_\_\_ 2018 р.

## **АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ № 5**

**Об'єкт впровадження:** науково-методичні основи розробки лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву

**Автор розробки:** Наумчук Ю.А., здобувач кафедри біомедичної інженерії КПІ імені Ігоря Сікорського.

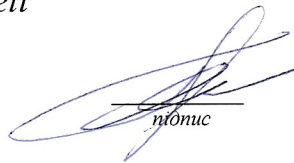
**Джерела інформації стосовно розробки, що пропонується:**

- Ю.А. Наумчук, В.Б. Максименко, С. Кая, "Оптимізація тестів життєздатності клітин для скринінгу гліопротекторних сполук у культурі первинних астроцитів головки зорового нерву щура", Наукові вісті НТУУ "КПІ", № 6, С. , 2017
- Kaja S, Payne AJ, Naumchuk Y, Koulen P. Quantification of Lactate Dehydrogenase for Cell Viability Testing Using Cell Lines and Primary Cultured Astrocytes. Current Protocols in Toxicology 2017; Suppl. 72: 2.26
- Kaja S, Payne AJ, Naumchuk Y, Levy D, Zaidi DH, Altman AM, Nawazish S, Ghuman JK, Gerdes BC, Moore MA, Koulen P. Plate reader-based cell viability assays for glioprotection using primary rat optic nerve head astrocytes. Experimental Eye Research 2015; 138: 159-166.
- Kaja S, Payne AJ, Patel KR, Naumchuk Y, Koulen P. Differential subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in a highly specialized subpopulation of astrocytes. Exp Neurol. 2015; 265-59-68.
- Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, Kunjukunju N, Koulen P. Antioxidant drug therapy approaches for neuroprotection in chronic diseases of the retina. Int J Mol Sci. 2014; 15:1865-1886. PMID: 24473138

**Інформація про впровадження:** Інститут молекулярної біології і генетики НАН України вважає за доцільне впровадження у навчальний процес з біомедичного напрямку аспірантів Кафедри біології ІМБГ НАН України та студентів кафедри молекулярної біології КНУ імені Тараса Шевченка, навчання яких проводиться за участі науковців Інституту, науково-методичних основ розробки лактатдегідрогеназної системи для тестування гліопротекторів астроцитів зорового нерву, що пропонується, в рамках лекційних занять з курсів «Основи новітньої молекулярної біології і генетики» та «Біотехнології з використанням стовбурових клітин» відповідно.

**Відповідальні за впровадження:**

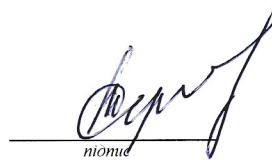
*Вчений секретар  
Інституту молекулярної біології  
і генетики НАН України  
к.б.н.*



підпис

Я.Р.Мишук

*Завідувач Кафедри біології  
Інституту молекулярної біології  
і генетики НАН України  
д.б.н.*



підпис

Т.А.Сергєєва

*Викладач Кафедри біології  
Інституту молекулярної біології  
і генетики НАН України  
д.б.н. професор*



підпис

Л.Л.Лукаш